

**Bloqueio do glucossensor T1R2/T1R3 em  
linhas celulares de glioblastoma, cancro  
de mama e cancro colorretal:  
Efeitos na proliferação celular, apoptose e  
migração  
(Versão Final após Defesa)**

**Carolina Alexandra Emídio Lucas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Biomédicas**  
(2<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Cecília Reis Alves dos Santos  
Co-orientadora: Mestre Ana Raquel Ferreira da Costa

**julho de 2022**



## **Declaração de Integridade**

Eu, Carolina Alexandra Emídio Lucas, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição m10488 de Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 27/06/2022



Carolina Alexandra Emídio Lucas



## Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Cecília Santos, pela orientação prestada, pela disponibilidade e oportunidade de poder integrar este trabalho e por todo o seu apoio científico para a realização desta dissertação.

À minha co-orientadora, Mestre Ana Raquel Costa, por todo o conhecimento transmitido, apoio, paciência e disponibilidade na ajuda na execução deste trabalho e por todos os ensinamentos em meio laboratorial.

À minha família por tudo o que fizeram e por acreditarem sempre em mim. Pelo apoio incondicional apesar das dificuldades encontradas pelo caminho, mas que com dedicação as consegui ultrapassar. Ao meu namorado pelo apoio inigualável e por me incentivar todos os dias a correr atrás dos meus sonhos.

À Covilhã e à FCS-UBI por me terem acolhido e por tudo o que me proporcionaram nestes últimos anos.

A todos os que estiveram presentes nesta etapa da minha vida, os meus agradecimentos.

Este trabalho de dissertação foi financiado no âmbito do financiamento plurianual do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI) pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através dos projetos UID/Multi/00709/2013 e UID/Multi/00709/2019, pelo CENTRO 2020 e Lisboa 2020 (POCI-01-0145-FEDER-016822), e fundos FEDER através do POCI – COMPETE 2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização no Eixo I – Reforço da Investigação, do desenvolvimento tecnológico e da inovação (POCI-01-0145-FEDER-007491). Adicionalmente foi financiado pela Liga Portuguesa Contra o Cancro (Núcleo da Região Centro) através da atribuição da Bolsa de Investigação em Oncologia Dr. Rocha Alves. Os dados de microscopia obtidos neste trabalho estão integrados na PPBI - Plataforma Portuguesa de BioImagem e são financiados pelo projeto POCI-01-0145-FEDER-022122.



## Resumo

O cancro é o maior problema de saúde pública e uma das principais causas de morte em todo o mundo. Apesar das terapias e tratamentos existentes, tais como ressecção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e terapias direcionadas, continua a aumentar a sua prevalência e mortalidade. O glioblastoma é o tumor cerebral primário mais comum e o que apresenta maior agressividade e pior prognóstico, é altamente resistente à radioterapia e quimioterapia, e não é controlado por ressecção cirúrgica. A sua elevada atividade proliferativa e vascularização, localização e quimioresistência, dificultam o seu tratamento. O cancro da mama e o cancro colorretal são dos cancros mais comuns e mortais em todo o mundo, perdurando a necessidade de terapias e medicamentos com menos efeitos adversos e com risco-benefício mais favorável, promovendo uma maior sobrevivência.

A maioria das células cancerosas apresentam características metabólicas específicas, uma vez que a glicólise prevalece sobre a fosforilação oxidativa como principal fonte de energia, mesmo na presença de oxigénio e com as mitocôndrias a funcionar normalmente. Esta reprogramação é conhecida como efeito *Warburg*, e é altamente dependente de elevadas concentrações de glucose de forma a garantir a sobrevivência e proliferação das células cancerosas. Recentemente, o nosso grupo de investigação mostrou a presença e funcionalidade do recetor do sabor doce, constituído pelas subunidades T1R2/T1R3, em três linhas celulares de glioblastoma. O T1R2/T1R3 liga-se a moléculas doces, tais como a glucose e, nas papilas gustativas, a sua principal função é a perceção do sabor doce. Noutros órgãos, o T1R2/T1R3 parece funcionar como glucossensor da disponibilidade de glucose. Este trabalho pretende confirmar a expressão e compreender o efeito do bloqueio do T1R2/T1R3, em linhas celulares de glioblastoma, cancro da mama e cancro colorretal.

Foi possível confirmar a expressão das subunidades T1R2 e T1R3 do recetor nas linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2). Adicionalmente, verificou-se que a inibição, com lactisole, da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce levou à diminuição da viabilidade e migração das células de glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG), cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2), mas sem aumentar a apoptose ou a morte celular. A inibição do recetor também levou à diminuição do *uptake* da glucose na linha celular de glioblastoma SNB-19. Os resultados obtidos mostram a importância deste recetor para o crescimento das células

cancerosas, e que o mesmo poderá ser um importante glucossensor da disponibilidade de glucose com impacto na progressão e crescimento dos tumores.

## **Palavras-chave**

Glioblastoma; cancro da mama; cancro colorretal; efeito Warburg; recetores do sabor doce; lactisole

## Abstract

Cancer is a major public health problem and one of the leading causes of death worldwide. Despite the existing therapies and treatments, such as surgical resection, radiotherapy, chemotherapy and targeted therapies, its prevalence and mortality continues to increase. Glioblastoma is the most common primary brain tumor and the most aggressive and worse prognosis, as it is highly resistant to radiotherapy and chemotherapy, not controlled by surgical resection. Its high proliferative activity and vascularization, location and chemoresistance difficult its treatment. Breast cancer and colorectal cancer are among the most common and deadly cancers worldwide, and there is a continuing need for therapies and drugs with fewer adverse effects and more favourable risk-benefit, promoting greater survival.

Most cancer cells have specific metabolic characteristics, since glycolysis prevails over oxidative phosphorylation as the main energy source, even in the presence of oxygen and normally functioning mitochondria. This reprogramming is known as the Warburg effect, and it is highly dependent on high concentrations of glucose in order to ensure the survival and proliferation of cancer cells. Recently, our research group showed the presence and functionality of the sweet taste receptor, constituted by T1R2/T1R3 subunits, in three glioblastoma cell lines. T1R2/T1R3 binds to sweet molecules such as glucose and, in the taste buds, its main function is the perception of sweet taste. In other organs, T1R2/T1R3 appears to function as a glucosensor for glucose availability. This work aims to confirm the expression and understand the effect of blocking the T1R2/T1R3, in glioblastoma, breast and colorectal cancer cell lines.

It was possible to confirm the expression of sweet taste receptor T1R2 and T1R3 subunits in breast cancer (MCF7) and colorectal cancer (Caco-2) cell lines. Additionally, the inhibition of the sweet taste receptor T1R3 subunit with lactisole led to decreased viability and migration of glioblastoma cells (U-87MG, SNB-19 and U-373MG), breast cancer (MCF7) and colorectal cancer (Caco-2), but without increasing apoptosis or cell death. Inhibition of the sweet taste receptor also led to decreased glucose uptake in the SNB-19 glioblastoma cell line. The results obtained show the importance of this receptor for the growth of cancer cells, and that it may be an important glucosensor of glucose availability with an impact on the progression and growth of tumors.

## **Keywords**

Glioblastoma; breast cancer; colorectal cancer; Warburg effect; sweet taste receptors; lactisole

# Índice

<b>Introdução</b> .....	1
1.1 Cancro .....	1
1.1.1 Glioblastoma .....	3
1.1.2 Cancro da mama .....	3
1.1.3 Cancro colorretal .....	4
1.2 Metabolismo da glucose no cancro e efeito <i>Warburg</i> .....	7
1.3 Recetores do sabor .....	10
1.3.1 Via de transdução do sabor .....	10
1.3.2 Recetor do sabor doce .....	11
1.3.3 Expressão extraoral do recetor do sabor doce .....	11
1.3.4 Expressão do recetor do sabor doce no cancro .....	17
1.3.5 Lactisole .....	17
<b>Objetivos</b> .....	19
<b>Material e Métodos</b> .....	21
3.1 Materiais e reagentes .....	21
3.2 Cultura celular .....	21
3.2.1 Passagem celular .....	22
3.2.2 Contagem celular .....	22
3.3 Expressão génica do recetor do sabor doce .....	22
3.3.1 Análise de dados de <i>microarrays</i> .....	23
3.3.2 Extração de RNA total e tratamento com DNase I .....	23
3.3.3 Quantificação do RNA total .....	24
3.3.4 Síntese de cDNA .....	24
3.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	24
3.4 Imunocitoquímica .....	25
3.5 Ensaio de viabilidade celular .....	26
3.6 Ensaio de migração celular .....	26
3.7 Ensaio da apoptose celular .....	27
3.8 Ensaio de consumo da glucose .....	28
3.9 Análise estatística .....	28
<b>Resultados</b> .....	31
4.1 Expressão génica do recetor do sabor doce .....	31
4.2 Imunocitoquímica .....	32
4.3 Viabilidade celular .....	33
4.4 Migração celular .....	35

4.5 Apoptose celular .....	40
4.6 Consumo da glucose.....	45
<b>Discussão</b> .....	47
<b>Conclusão e Perspetivas Futuras</b> .....	51
<b>Bibliografia</b> .....	53

## Lista de Figuras

Figura 1 – As fases de desenvolvimento do tumor.

Figura 2 – *Hallmarks* do cancro.

Figura 3 – Representação esquemática da diferença do metabolismo da glucose entre células normais e células cancerosas.

Figura 4 – Modelo esquemático do recetor do sabor doce.

Figura 5 – Sinalização através do recetor T1R2/T1R3 em células tipo II nas papilas gustativas, no intestino e nas células  $\beta$  do pâncreas.

Figura 6 – Eletroforese em gel dos produtos de PCR das subunidades (A) T1R2 e (B) T1R3 do recetor do sabor doce nas linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2).

Figura 7 - Imagens representativas da expressão das subunidades T1R2 e T1R3 do recetor do sabor doce nas linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2).

Figura 8 – Efeitos do bloqueio da subunidade T1R3 do recetor de sabor doce na viabilidade celular das linhas celulares de glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG), cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2).

Figura 9 – O bloqueio da subunidade T1R3 reduz a taxa de migração da linha celular de glioblastoma U-87MG.

Figura 10 – O bloqueio da subunidade T1R3 reduz a taxa de migração da linha celular de glioblastoma SNB-19.

Figura 11 – O bloqueio da subunidade T1R3 reduz a taxa de migração da linha celular de glioblastoma U-373MG.

Figura 12 – O bloqueio da subunidade T1R3 reduz a taxa de migração da linha celular de cancro da mama MCF7.

Figura 13 – O bloqueio da subunidade T1R3 reduz a taxa de migração da linha celular de cancro colorretal Caco-2.

Figura 14 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular U-87MG.

Figura 15 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular SNB-19.

Figura 16 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular U-373MG.

Figura 17 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular MCF7.

Figura 18 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular Caco-2.

Figura 19 – Efeitos do bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce no consumo da glucose da linha celular de glioblastoma SNB-19.

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Função e expressão extraoral em órgãos/tecidos do recetor do sabor doce (T1R2/T1R3).

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados.

Tabela 3 – Expressão das subunidades T1R2 e T1R3 que constituem o recetor do sabor doce nas linhas celulares de cancro de mama (MCF7) e de cancro colorretal (Caco-2), a partir de bases de dados de transcriptómica disponíveis no repositório GEO (*Gene Expression Omnibus*).



## Lista de Abreviaturas

2-NBDG	<i>2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]-D- glucose</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Caco-2	Linha celular de adenocarcinoma colorretal humano
Ca <sup>2+</sup>	Ião cálcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Matriz extracelular ( <i>extracellular matrix</i> )
FBS	Soro fetal bovino ( <i>fetal bovine serum</i> )
GLUT	Transportador de glucose ( <i>glucose transporter</i> )
GPCR	Recetor associado à proteína G ( <i>G protein-coupled receptor</i> )
HG	<i>High glucose</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
MCF7	Linha celular de cancro da mama humano
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)-2,5-diphenyl-212 tetrazolium bromide</i>
Na <sup>+</sup>	Ião sódio
O <sub>2</sub>	Oxigénio
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline</i> contendo Tween-20
PFA	Paraformaldeído
T1R	Recetor do sabor, tipo 1
T1R1	Recetor do sabor, tipo 1, membro 1
T1R2	Recetor do sabor, tipo 1, membro 2
T1R3	Recetor do sabor, tipo 1, membro 3
T2R	Recetor do sabor, tipo 2



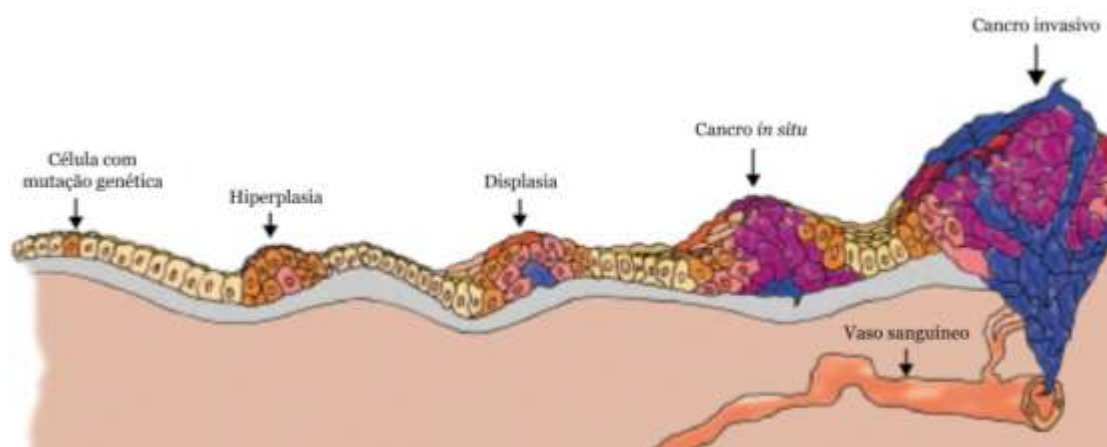
# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Cancro

O cancro é caracterizado pelo crescimento celular descontrolado e aquisição de propriedades metastáticas, acompanhado pela ativação de oncogenes e/ou desativação de genes supressores de tumores. Tais acontecimentos promovem a desregulação do ciclo celular e a inativação de mecanismos apoptóticos (Vogelstein e Kinzler 2004; Sarkar et al. 2013). De acordo com a estimativa da Globocan, em 2020, ocorreram 19.29 milhões de novos casos de cancro, 9.96 milhões de pessoas morreram de cancro e a prevalência (5 anos) é de aproximadamente 50.55 milhões de pessoas (Ferlay et al. 2020).

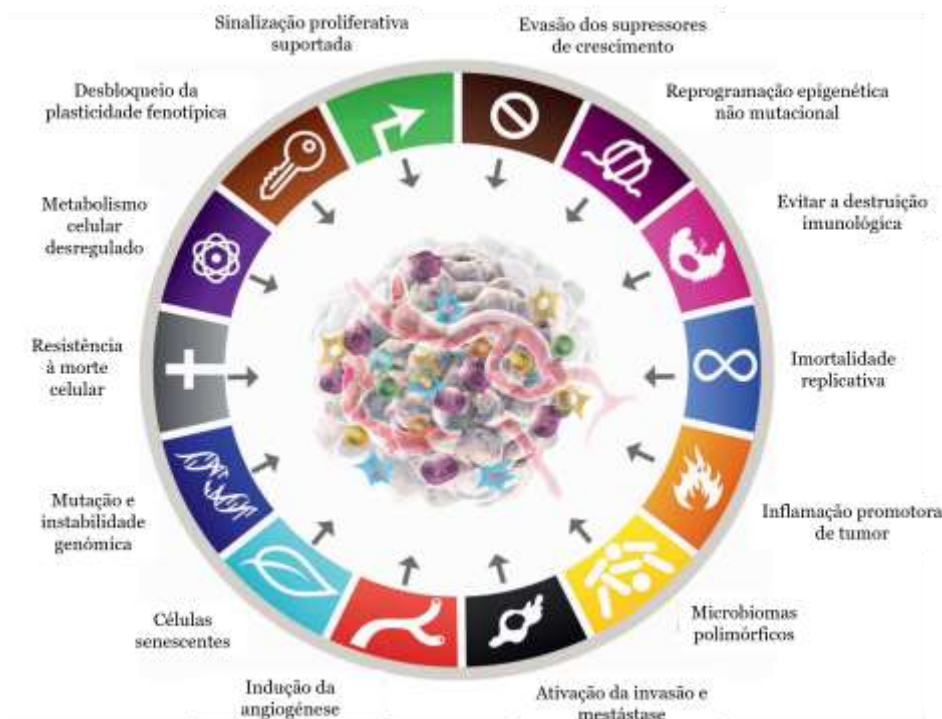
O desenvolvimento de cancro inicia-se quando uma célula se liberta das restrições normais da divisão celular e prolifera de forma independente, sendo que todas as células derivadas da primeira irão também exibir uma proliferação inadequada. Essas células anormais formam um tumor ou massa de células que podem permanecer dentro do tecido que lhes deu origem (cancro *in situ*) ou podem invadir outros tecidos próximos (cancro invasivo). Um tumor invasivo é considerado maligno uma vez que as células podem entrar na circulação, sangue ou linfa, e podem estabelecer novos tumores por todo o corpo (metástases) (figura 1). Quando o crescimento do tumor perturba os tecidos ou órgãos onde se localiza pode ameaçar a vida do indivíduo (National Institutes of Health (US) 2007).



**Figura 1 – Fases de desenvolvimento de um tumor.** O tumor começa a desenvolver-se quando uma célula sofre uma mutação tornando-a mais propensa a dividir-se do que num estado normal. A célula alterada e os seus descendentes crescem e dividem-se com muita frequência, numa condição chamada

hiperplasia. Em determinado ponto, uma dessas células passa por outra mutação, aumentando ainda mais a sua tendência de divisão. Os descendentes dessa célula dividem-se de forma excessiva tornando-a anormal, uma condição chamada displasia. Com o passar do tempo, uma das células passa por outra mutação e esta célula e os seus descendentes tornam-se muito anormais em crescimento e aparência. O tumor formado a partir dessas células e contido no tecido de origem é chamado de cancro *in situ*, o qual pode permanecer contido indefinidamente. Se em algumas células ocorrerem mutações adicionais, o tumor poderá invadir os tecidos vizinhos e libertar células no sangue ou na linfa, tornando-se num tumor maligno. As células que escapam podem estabelecer novos tumores (metástases) noutras locais do corpo. (Adaptado de National Institutes of Health (US) 2007).

Durante as várias etapas do desenvolvimento de um tumor humano são adquiridas catorze capacidades biológicas, denominadas *hallmarks* do cancro (figura 2), uma vez que os tumores reprogramam as suas vias metabólicas de modo a atender às necessidades biológicas que permitam a sobrevivência e crescimento das células cancerosas (Hanahan e Weinberg 2011; DeBerardinis e Chandel 2016; Hanahan 2022). Desta forma, estas atividades reprogramadas possibilitam que as células tumorais absorvam os nutrientes abundantes e os utilizem para produzir ATP (adenosina trifosfato), gerar precursores biossintéticos e macromoléculas, e tolerar *stress* associado à malignidade, como o *stress* redox e a hipóxia (DeBerardinis e Chandel 2016).



**Figura 2 – Hallmarks do cancro.** Capacidades biológicas adquiridas durante as várias etapas do desenvolvimento do tumor, que incluem a sustentação da sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, permitindo a imortalidade replicativa, indução da angiogénese,

ativação da invasão e metástase, reprogramação do metabolismo celular e evitar a destruição imunológica. Subjacentes a estas características estão a instabilidade genómica, que gera uma diversidade genética através da aceleração da sua aquisição, e a inflamação que promove múltiplas funções por parte das *hallmarks*. Contudo, existem novos potenciais *hallmarks* e características de habilitação que podem ser incorporados como componentes centrais da conceitualização dos *hallmarks* do cancro, como por exemplo o desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e células senescentes (Adaptado de Hanahan 2022).

A instabilidade genómica e as mutações determinam as *hallmarks* do cancro, uma das quais a capacidade de invasão e metástase das células tumorais (Hanahan e Weinberg 2011). A metástase é a principal causa de morte por cancro. Durante o processo de metástase, as células tumorais abandonam o local primário e espalham-se por todo o corpo, formando locais secundários e causando falência orgânica grave (Lambert, Pattabiraman, e Weinberg 2017). O primeiro passo da cascata metastática é a invasão, na qual as células tumorais penetram na membrana basal circundante e migram através da matriz extracelular (ECM) para o tecido circundante (Krakhmal et al. 2015). Existem diversos parâmetros diferentes no microambiente do tumor que influenciam a regulação da migração e invasão das células cancerosas tais como a presença de hipóxia, quimioatrações, rigidez da ECM e falta de nutrientes (Polacheck, Zervantonakis, e Kamm 2013). É importante realçar que durante a migração e invasão, o fenómeno da transição epitelial-mesenquimal é que determina a plasticidade das células tumorais, permitindo que elas mudem de um estado epitelial não móvel para um mesenquimal móvel. Tal acontecimento proporciona às células cancerosas múltiplas características malignas, como o aumento da invasividade, e resistência à senescência, apoptose e tratamento (Lambert, Pattabiraman, e Weinberg 2017).

Desta forma, o cancro pode desenvolver-se em qualquer um dos tecidos do corpo e cada tipo tem características únicas (National Institutes of Health (US) 2007).

### **1.1.1 Glioblastoma**

O glioblastoma é um tumor de grau IV do grupo dos gliomas, mais prevalente em humanos em idade adulta e o que apresenta maior agressividade e pior prognóstico, com uma sobrevivência média de 1 ano (Holland 2000; Stupp et al. 2005). Compreende cerca de 16% de todas as neoplasias primárias do cérebro e do sistema nervoso central, tornando-o o tumor cerebral maligno primário mais comum (Thakkar et al. 2014). A sua taxa de incidência ajustada por idade é de 3,2 por 100.000 habitantes e pode ocorrer em qualquer idade, mas afetando principalmente indivíduos com idade média de 64 anos (Thakkar et al. 2014; Q. T. Ostrom et al. 2014; Quinn T.

Ostrom et al. 2015). Adicionalmente, os glioblastomas apresentam uma ocorrência maior em homens do que em mulheres (1,6:1) (Ellor, Pagano-Young, e Avgeropoulos 2014).

O glioblastoma pode ser classificado como primário ou *de novo*, o qual surge sem evidência de um precursor menos maligno, ou secundário, onde um tumor de baixo grau se transforma ao longo do tempo em glioblastoma. A maioria dos glioblastomas (~90%) são primários, e esses pacientes tendem a ser mais velhos e a ter um pior prognóstico comparativamente com pacientes com glioblastoma secundário (Wilson, Karajannis, e Harter 2014). Este tipo de tumor ocorre quase exclusivamente no cérebro, podendo também surgir no tronco cerebral, no cerebelo e na medula espinhal. Inicialmente julgava-se que o glioblastoma surgia apenas de células gliais, mas de acordo com evidências recentes, este pode derivar de vários tipos de células com propriedades semelhantes às células estaminais neurais (Phillips et al. 2006).

O glioblastoma é altamente resistente à radioterapia e à quimioterapia convencionais e não é efetivamente controlado por ressecção cirúrgica (Wang et al. 2019). Este tipo de tumor é caracterizado por elevada atividade proliferativa e elevada vascularização (Schröder et al. 1991; G. Linkous e M. Yazlovitskaya 2011). A ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e quimioterapia são os tratamentos base para o glioblastoma (Urbańska et al. 2014). O *temozolomide* é o agente quimioterapêutico mais usado para o tratamento de glioblastoma, uma vez que aumenta a taxa de sobrevivência dos pacientes de 12,1 meses para 14,6 meses e a sua utilização em coadjuvação com radioterapia tem proporcionado um aumento dessa taxa e uma menor toxicidade (Stupp et al. 2005; Wang et al. 2019). Contudo, devido à sua localização e infiltração em tecidos circundantes, à existência da barreira hematoencefálica e à possibilidade de células tumorais se encontrarem em áreas de hipóxia (baixa concentração de oxigênio), o tratamento do glioblastoma torna-se difícil, apesar do desenvolvimento de novas estratégias e técnicas (Karcher et al. 2006; Chang et al., 2007).

### **1.1.2 Cancro da mama**

O cancro da mama é o cancro mais comum e um dos mais mortais entre mulheres por todo o mundo. Todos os anos, mais de 1,5 milhões de mulheres (cerca de 25% de todas as mulheres com cancro) mundialmente são diagnosticadas com cancro da mama. O cancro da mama é um cancro metastático e a sua incidência é maior com a idade, embora aproximadamente 7-10% das mulheres diagnosticadas tenham menos de 40 anos (Sun et al., 2017; Rossi, Mazzara, e Pagani 2019). Para além da sua ocorrência

maioritariamente em mulheres, o cancro da mama apresenta uma incidência de 1% em homens (Zehr et al., 2019). O diagnóstico precoce deste tipo de cancro é uma das melhores formas de prevenção desta doença, uma vez que permite um melhor prognóstico e, para além disso, proporciona uma taxa de sobrevivência relativa de 5 anos superior a 80% em pacientes com cancro da mama (Sun et al., 2017). O cancro da mama é uma doença complexa com alto grau de heterogeneidade e pode ser classificado como não invasivo ou invasivo (Perou et al. 2000; Akram et al. 2017). Os cancros da mama não invasivos ocorrem quando não se estendem para longe do lóbulo ou ductos onde foram originados, como o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma lobular *in situ* (Vranso West et al. 2017; Akram et al. 2017). Por outro lado, os cancros da mama invasivos ou metastáticos ocorrem quando células anormais dentro dos lóbulos ou ductos de leite se dividem nas proximidades do tecido mamário e se estendem a diferentes órgãos do corpo, levando a que as células cancerosas passem através da mama para diferentes partes do corpo através do sistema imunológico ou da circulação sistémica (Stevanovic et al. 2006; Ziperstein, Guzman, e Kaufman 2016; Krop et al. 2017). Os órgãos mais comuns para onde essas células se espalham são cérebro, ossos, pulmões e fígado (Page et al. 2017). Exemplos de cancros da mama invasivos são o carcinoma lobular infiltrante, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma medular e carcinoma tubular (Akram et al. 2017).

O tratamento de cancro da mama envolve uma estratégia multimodal através da combinação da quimioterapia neoadjuvante, cirurgia operável, radioterapia e quimioterapia adjuvante e/ou terapia endócrina (Fisusi e Akala 2019). Uma vez que o cancro da mama é uma doença complexa com alto grau de heterogeneidade inter e intra-tumoral, a sua subclassificação inicial tem sido uma grande valia em termos de tratamento direcionado, como terapias hormonais (por exemplo, tamoxifeno) e terapia direcionada ao recetor ERBB2 (HER2) (por exemplo, trastuzumabe), levando a melhores prognósticos (Perou et al. 2000; METABRIC Group et al. 2012; Marusyk, Almendro, e Polyak 2012; The Cancer Genome Atlas Network 2012; Yeo and Guan 2017).

Porém, a terapia médica do cancro da mama com anti-estrogénios como raloxifeno ou tamoxifeno pode evitar que este se volte a manifestar em indivíduos com maior possibilidade de desenvolvê-lo (Peng, Sengupta, e Jordan 2009). A cirurgia de ambas as mamas é uma medida preventiva adicional em mulheres com uma alta probabilidade de desenvolver cancro. Em pacientes que foram identificados com cancro da mama, diferentes estratégias têm sido utilizadas, como terapia-alvo, terapia hormonal, radioterapia, cirurgia e quimioterapia. Em indivíduos com metástases, estas estratégias

geralmente visam melhorar a qualidade de vida e a taxa de sobrevivência (Reeder J e Vogel V 2008). Contudo, apesar das terapias existentes, ainda existe a necessidade de desenvolver tratamentos e medicamentos com menos efeitos adversos e uma relação risco-benefício favorável (Sun et al., 2017).

### **1.1.3 Cancro colorretal**

Até há alguns anos atrás, o cancro colorretal apresentava baixa incidência. Porém, atualmente, o cancro colorretal é o segundo e o terceiro cancro mais comum em mulheres e homens, respetivamente, e encontra-se entre os cancros malignos mais letais e prevalentes no mundo (Kuipers et al. 2015; Xie, Chen, e Fang 2020). A sua taxa de incidência ajustada por idade é maior em homens (20,6/100.000 indivíduos) do que em mulheres (14,3/100.000), sendo que a maioria dos pacientes com cancro esporádico tem mais de 50 anos de idade (Kuipers et al. 2015). Todavia, o cancro colorretal apresenta uma taxa de sobrevivência de 5 anos de aproximadamente 64%, mas apenas de 12% em cancro colorretal metastático (Siegel, Miller, e Jemal 2019).

O cancro colorretal pode ser distinguido em três tipos de acordo com as suas formas de origem e expressão: a) a forma esporádica representa entre 60-80% e caracteriza-se por não apresentar qualquer tipo de relação familiar, aparecendo em indivíduos sem mutação que os torne suscetíveis a desenvolver este tipo de cancro; b) o tipo familiar, que constitui 20-40% dos casos e para o qual nenhum gene associado foi identificado, mas cujos estudos populacionais mostram uma probabilidade 2-3 vezes superior de desenvolvimento quando familiares de consanguinidade primária sofrem de cancro colorretal esporádico; c) o tipo hereditário, no qual duas variantes tumorais que podem ser distinguidas pela predisposição de estar ou não relacionada à presença de pólipos adenomatosos (de Campos et al. 2010; Watson e Collins 2011; Hassen 2012; Lin 2012; Arvelo 2015).

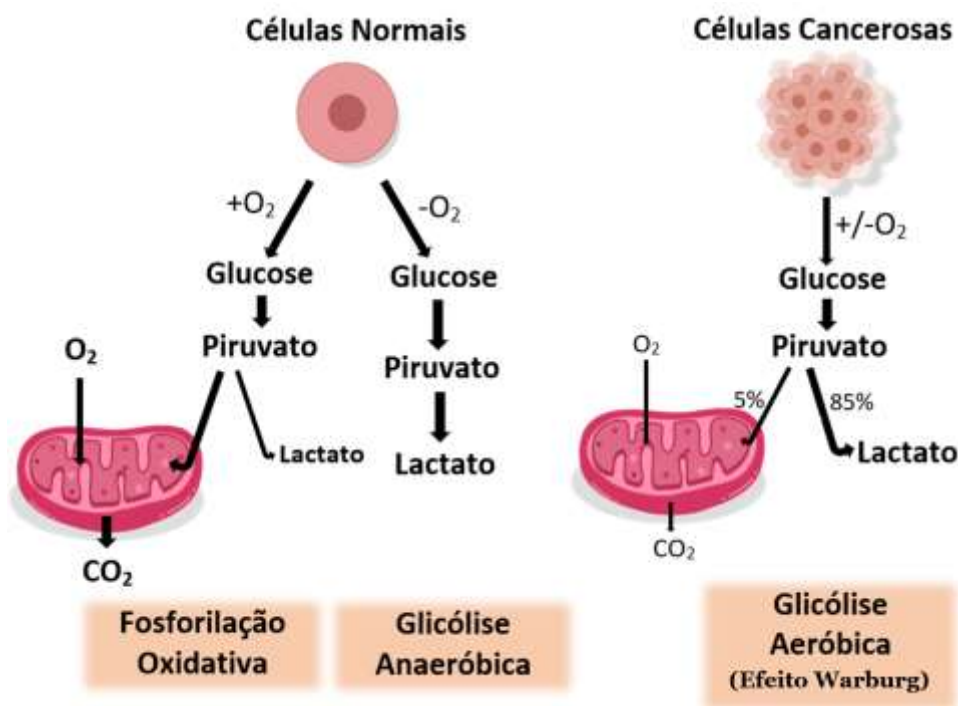
Recentemente, surgiram novos tratamentos para o cancro colorretal que incluem cirurgia laparoscópica e ressecção cirúrgica, que são as primeiras escolhas de tratamento para os pacientes com este tipo de cancro. No entanto, essas novas opções de tratamento têm um impacto limitado nas taxas de cura e na sobrevivência a longo prazo, tornando o prognóstico de cancro colorretal não satisfatório (Kuipers et al. 2015; Xie, Chen, e Fang 2020). Atualmente, a escolha do tratamento para pacientes com cancro colorretal envolve uma abordagem multimodal na qual os pacientes são classificados num de quatro diferentes grupos de risco usados para orientar a estratégia de tratamento: grupo 0) pacientes sem doença metastática ou com metástases

hepáticas ou pulmonares ressecáveis e sem sinais de mau prognóstico, em que o tratamento recomendado consiste na ressecção cirúrgica da metástase; grupo 1) pacientes com doença metastática potencialmente ressecável, inicialmente tratados com quimioterapia de indução para reduzir o número e tamanho das metástases e possibilitar a ressecção cirúrgica posterior; grupo 2) pacientes com doença disseminada irressecável, com tratamento paliativo de forma a reduzir os sintomas, agressividade e extensão da doença.; grupo 3) pacientes com doença irressecável e falta de tratamento intensivo ou sequencial (Van Cutsem, Nordlinger, e Cervantes 2010; Van Cutsem et al. 2014). Porém, apesar das novas e promissoras opções de tratamento para pacientes com cancro colorretal, permanece a necessidade de desenvolver tratamentos ainda mais individualizados que promovam uma maior sobrevivência, com menos reações adversas e um potencial de recuperação total (Xie, Chen, e Fang 2020).

## **1.2 Metabolismo da glucose no cancro e efeito *Warburg***

O metabolismo da glucose é o processo essencial para sustentar a vida de um mamífero. O processo de glicólise ocorre no citoplasma pela conversão de glucose em piruvato. Requer o transporte de glucose para as células através de transportadores de glucose (GLUTs) e transportadores de sódio-glucose (Navale e Paranjape 2016). Assim, através da oxidação das ligações de carbono da glucose, a energia obtida é aproveitada na forma de ATP e após a finalização da glicólise, nas etapas seguintes, o produto final formado pode ser o lactato ou dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), caso ocorra a oxidação total da glucose pelo processo de respiração mitocondrial (Liberti e Locasale 2016).

A progressão do cancro envolve uma proliferação inapropriada de células, que apresentam capacidades aprimoradas para a produção de energia com o intuito de resistir ao *stress* metabólico (Vander Heiden, Cantley, e Thompson 2009). Assim, as células cancerosas são capazes de reprogramar o seu metabolismo de modo a promover o crescimento, sobrevivência, proliferação e manutenção durante longos períodos de tempo. Adicionalmente, ocorre também um aumento drástico na taxa de *uptake* da glucose e na produção de lactato, mesmo na presença de oxigénio e do normal funcionamento da mitocôndria. Esta mudança metabólica associada à malignidade, conhecida como efeito *Warburg*, provoca esse aumento da glicólise aeróbia no cancro (figura 3). Deste modo, as células tumorais, ao contrário das células normais que dependem principalmente da fosforilação oxidativa, dependem maioritariamente da glicólise aeróbica para produzir energia (Liberti e Locasale 2016).



**Figura 3 - Representação esquemática da diferença entre o metabolismo da glicose em células normais e células cancerosas.** Em células normais, na presença de oxigênio ( $O_2$ ), ocorre a metabolização da glicose em piruvato via glicólise seguida de oxidação da maior parte do piruvato obtido em dióxido de carbono ( $CO_2$ ) na mitocôndria, processo denominado fosforilação oxidativa; na ausência de  $O_2$ , as células metabolizam o piruvato em lactato num processo chamado glicólise anaeróbica, que resulta na produção mínima de ATP comparativamente à fosforilação oxidativa. Por outro lado, as células cancerosas, independentemente da presença ou ausência de  $O_2$  e do funcionamento normal da mitocôndria, tendem a converter a maior parte da glicose em lactato (glicólise aeróbica), processo denominado efeito *Warburg*. Relativamente à geração de ATP, a glicólise aeróbia é menos eficiente que a fosforilação oxidativa (Liberti e Locasale 2016).

As células cancerosas adaptam-se ao baixo rendimento energético da glicólise através do aumento do *uptake* de glicose para suportar a taxa glicolítica mais elevada (Liberti e Locasale 2016). É provável que a elevada taxa de glicólise beneficie as células cancerosas, uma vez que proporciona uma elevada taxa de produção de ATP e fornece muitos intermediários, que são usados nas vias metabólicas adjuntas, para a síntese *de novo* de nucleótidos, aminoácidos, lípidos e NADPH (fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida), necessários para uma rápida proliferação celular (Lunt e Vander Heiden 2011). No entanto, a presença da glicólise aeróbica em condições normóxicas (níveis normais de oxigênio) e com mitocôndrias funcionalmente eficientes tornou-se, sem dúvida, uma impressão digital das células cancerosas, que pode contribuir para a possibilidade de a glicólise tumoral ser usada como um potencial alvo para a terapia do cancro (Abdel-Wahab, Mahmoud, e Al-Harizy 2019).

Recentemente, vários estudos comprovaram que, embora a glicólise aeróbica seja a principal fonte de energia das células cancerosas, também está envolvida na ativação de oncogenes (genes envolvidos no aparecimento e crescimento de tumores) como o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), o fator induzido por hipóxia-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) e c-MYC. Estes são responsáveis por induzir a quimiorresistência no cancro através da sobre-expressão de GLUTs e enzimas importantes na glicólise. Por outro lado, a glicólise aeróbica atua sinergicamente na indução de mudanças no microambiente tumoral tornando-o hipóxico e ácido, uma vez que ocorre um aumento da glicólise e uma diminuição da oxidação mitocondrial, que proporciona o aumento da formação de ácido láctico, o aumento da glutaminólise, o aumento da beta-oxidação de ácidos gordos e a ativação da via das pentoses fosfato (Seyfried e Shelton 2010; Liu, Jin, e Fan 2021).

O lactato, um produto da glicólise, bloqueia a eficácia dos medicamentos quimioterapêuticos, os quais são maioritariamente bases fracas, devido ao microambiente tumoral hipóxico e ácido, possibilitando o seu aprisionamento e neutralização, contribuindo para a quimiorresistência no cancro. Assim, pode-se afirmar que a glicólise tumoral tem um papel importante na resistência do cancro (Abdel-Wahab, Mahmoud, e Al-Harizy 2019; Liu, Jin, e Fan 2021).

Embora mais estudos sejam necessários para determinar o mecanismo exato da quimiorresistência induzida pelo efeito Warburg, têm vindo a ser realizados estudos sobre inibidores direcionados aos GLUTs, enzimas e vias de sinalização. Tal abordagem tem-se mostrado eficaz em suprimir a progressão do tumor, e vários desses inibidores glicolíticos estão atualmente sob investigação em estudos pré-clínicos e clínicos com resultados promissores (Abdel-Wahab, Mahmoud, e Al-Harizy 2019). Esses agentes anti-glicolíticos, como por exemplo a floretina e WZB117, podem ter como alvo os GLUTs ou enzimas glicolíticas, tais como a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), lactato desidrogenase A (LDH-A) ou piruvato desidrogenase quinase (PDK). Portanto, a inibição da atividade da glicólise aeróbica tem o potencial de fornecer uma nova hipótese de terapia clínica (Zhou et al. 2010; Liu et al. 2012; Velpula et al. 2013; Ganapathy-Kanniappan et al. 2013; Liberti et al. 2017; Wu et al. 2018; Liu, Jin, e Fan 2021).

### 1.3 Recetores do sabor

O paladar é um sentido primordial que permite aos humanos e outros organismos identificar e avaliar a qualidade nutricional de alimentos de sabor doce e rejeitar venenos de sabor amargo (Lindemann 2001). A designação “recetores do sabor” deriva inicialmente da sua identificação em pequenos grupos de células epiteliais especializadas, presentes nas papilas gustativas, da língua. Por outro lado, o termo "sabor" é geralmente usado para descrever as sensações ao nível do paladar que ocorrem na cavidade oral (Hoon et al., 1999).

A perceção do sabor pode ser distinguida em cinco tipos: salgado, azedo, amargo, umami e doce (Lindemann 2001). Os sabores azedo e salgado são mediados diretamente por canais iónicos, contrariamente aos sabores doce, amargo e umami, que são mediados por recetores acoplados à proteína G (GPCRs) (Nelson et al. 2001; X. Li et al. 2002; Zhao et al. 2003; Damak et al. 2003).

Relativamente aos recetores do sabor mediados por GPCRs, estes dividem-se em 2 famílias: os recetores do sabor tipo 1 (T1Rs; Tas1r em roedores e TAS1R em humanos), constituídos pelos membros 1 (T1R1), 2 (T1R2) e 3 (T1R3); e os recetores do sabor tipo 2 (T2Rs; Tas2r em roedores e TAS2R em humanos), constituídos por 25 membros em humanos. Os T1Rs, sob forma de heterodímeros constituídos pelas subunidades T1R1/T1R3 e T1R2/T1R3 são responsáveis por detetar os sabores umami e doce, respetivamente, enquanto os T2Rs funcionam como recetores do sabor amargo (Chandrashekar et al. 2006).

Os recetores relacionados com o paladar funcionam como quimiorrecetores que, quando expostos a estímulos do paladar ou ligandos, dão início à transdução de um sinal ao cérebro que resulta na perceção do sabor (Bachmanov e Beauchamp 2007). Os recetores do sabor foram inicialmente descobertos na cavidade oral, mais propriamente na língua. No entanto, um enorme número de estudos revelou que estes recetores, bem como as moléculas de transdução do sabor, também se encontram expressos em órgãos extraorais, tais como: estômago, intestino, fígado, pâncreas, sistema respiratório, glândula da tiroide, coração, cérebro, rins, bexiga, tecido adiposo, testículos, espermatozoides, ovários, linfócitos, glândulas endócrinas e pele (Raybould 1998; Ren et al. 2009; Dehkordi et al. 2012; F. Li 2013; Yamamoto e Ishimaru 2013; Foster et al. 2013; Masubuchi et al. 2013; D’Urso e Drago 2021). Contudo, apesar da sua função fisiológica ainda não ser totalmente compreendida, parecem regular a homeostase do corpo e ter um papel de defesa adicional contra patogénios (D’Urso e Drago 2021).

Deste modo, pode afirmar-se que a expressão destes recetores por todo o corpo é essencial para que ocorra a perceção de certas substâncias químicas (Gilca e Dragos 2017).

### **1.3.1 Via de transdução do sabor**

Na cavidade oral, as células gustativas são apenas responsivas por uma qualidade gustativa e são divididas em 4 tipos distintos (I-IV) de acordo com as suas características morfológicas e moleculares. O tipo I apresenta qualidades semelhantes aos astrócitos, os tipos II e III funcionam como elementos transdutores e o tipo IV são células imaturas. Atualmente, pensa-se que as células gustativas tipo II detetam o sabor amargo, doce e umami por meio de ativação dos GPCRs específicos para cada sabor (Kinnamon e Finger 2019).

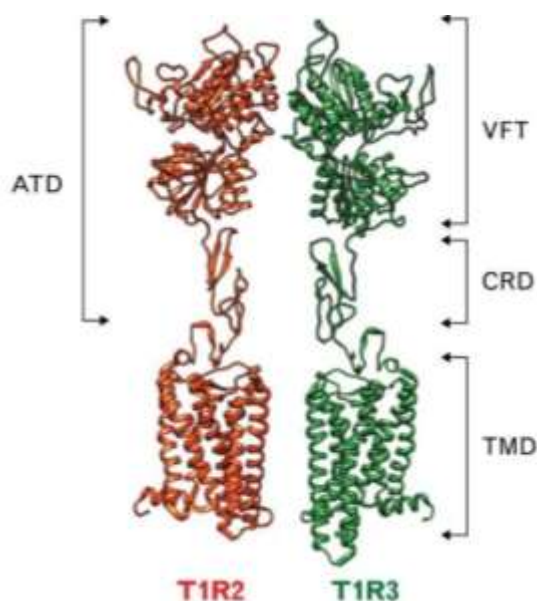
Apesar de detetarem substâncias de diferentes sabores, tanto os T1Rs como os T2Rs ativam as mesmas proteínas efetoras da via de sinalização do paladar. A ligação dos ligandos aos recetores do sabor induz uma mudança conformacional no recetor e na ativação de uma série de transdutores de sinal, como a proteína G heterotrimérica específica do sabor, a gustaducina (formada pelas subunidades  $\alpha$ -gustaducina, G $\beta$ 3 e G $\gamma$ 13), que por sua vez leva à ativação da fosfolipase C beta 2 para clivagem do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em diacilglicerol, produzindo inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). O IP<sub>3</sub> abre os canais iónicos do recetor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3, desencadeando um aumento nos níveis intracelulares de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) que, por sua vez, leva à ativação de um canal catiónico seletivo do sabor, o membro 5 da subfamília M dos canais recetores de potencial transitório (TRPM5), que eventualmente vai desencadear a despolarização da célula (Chandrashekar et al. 2006; Chaudhari e Roper 2010).

### **1.3.2 Recetor do sabor doce**

O papel fisiológico do paladar é fornecer a capacidade de detetar os principais nutrientes antes da ingestão e evitar o gosto amargo, potencialmente nocivo de moléculas. Entre as cinco qualidades básicas do sabor, o sabor doce é um dos principais determinantes da escolha alimentar, pois indica a presença de carboidratos ricos em energia, como a glucose, que aumentam o tom hedónico (agradabilidade, desagradabilidade ou neutrabilidade de um sabor) dos alimentos e influenciam fortemente o comportamento alimentar. No início dos anos 2000, foi reportado que a

deteção do sabor doce é em grande parte mediada por um único recetor constituído pelas subunidades T1R2/T1R3 (figura 3) (Behrens e Meyerhof 2011).

Para serem funcionais, as subunidades T1R1 e T1R2 necessitam de formar um heterodímero com a subunidade T1R3. Assim, acredita-se que as subunidades T1R1, T1R2 e T1R3 pertençam à classe C da família dos GPCRs, que compartilham uma arquitetura comum, incluindo um grande domínio aminoterminal contendo um domínio *Venus Fly Trap* e um domínio curto rico em cisteína, que liga o domínio aminoterminal ao domínio  $\alpha$ -helicoidal transmembranar característico dos GPCRs (figura 3) (Behrens e Meyerhof 2011).



**Figura 4 - Modelo esquemático do recetor do sabor doce.** O recetor do sabor doce é composto por duas subunidades: T1R2 e T1R3. As duas subunidades pertencem aos recetores acoplados à proteína G da classe C. T1R2 e T1R3 possuem um grande domínio aminoterminal (ATD) que inclui o domínio *Venus Fly Trap* (VFT) ligado a um domínio transmembranar helicoidal (TMD) característico dos GPCRs através de um domínio curto rico em cisteína (CRD). O VFT é composto por dois lobos separados por uma grande fenda, à qual a maioria dos adoçantes se ligam. (Adaptado de Laffitte, Neiers, e Briand 2014). PDB ID: 5X2N, 5X2Q, 5X2P, 5X2O, 5X2M.

Os compostos doces, nos mamíferos, são detetados na língua através das papilas gustativas. A ativação do recetor do sabor doce pode ser devida não só à ligação de diversos açúcares (glucose, frutose, sacarose e maltose) mas também de ligandos com estruturas químicas diferentes, como adoçantes artificiais (sacarina, aspartame, ciclamato), aminoácidos doces (D-triptofano, D-fenilalanina, D-serina) e proteínas doces (monelina, brazzeína, taumatina) (Jiang, Cui, Zhao, Snyder, et al. 2005). Tal como referido anteriormente, a ligação do ligando ao recetor do sabor doce origina uma

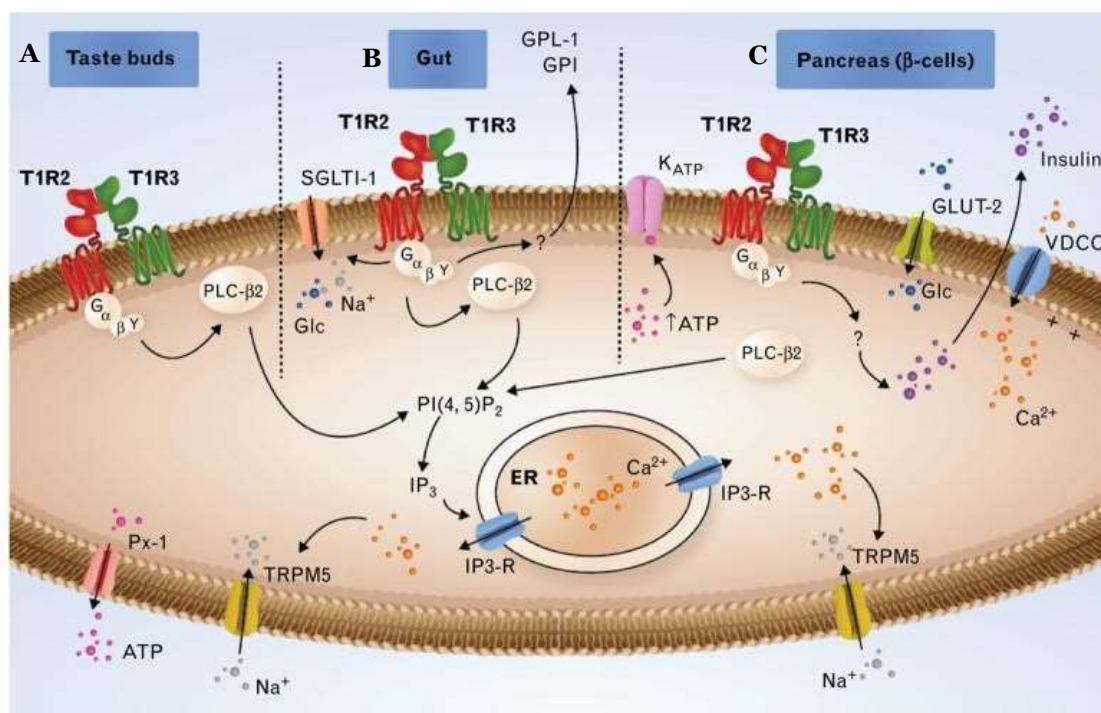
mudança na sua conformação que leva à ativação de uma sinalização intracelular (von Molitor et al. 2021). Apesar dos benefícios associados ao sabor doce, uma vez que o estímulo doce presente nos alimentos é indicativo de segurança no que diz respeito à ingestão de toxinas venenosas e fonte de ingestão calórica, o sabor doce também apresenta as suas desvantagens visto que se encontra associado a fatores de risco cardiovascular e parece estar envolvido na síndrome metabólica (Howard e Wylie-Rosett 2002; Reed e McDaniel 2006; Bano 2013).

Dado que o recetor do sabor doce é responsável por reconhecer estímulos doces, e devido à sua associação a inúmeras doenças, diversos inibidores farmacológicos com potencial terapêutico em humanos têm vindo a ser identificados, como o lactisole, o ácido 2-(2,4-diclorofenoxi) propiónico (2,4-DP) e o ácido gimnémico (Sigoillot et al. 2012; Nakagita et al. 2020). De entre estes inibidores, o lactisole é o candidato com maior interesse e mais estudado, uma vez que atua numa região específica da subunidade T1R3 (Xu et al. 2004; Jiang, Cui, Zhao, Snyder, et al. 2005).

### **1.3.3 Expressão extraoral do recetor do sabor doce**

Relativamente à localização do T1R2/T1R3, aparentemente este não é apenas responsável pela deteção na cavidade oral, uma vez que também é expresso em vários tecidos extraorais, juntamente com as suas moléculas de sinalização (Yamamoto e Ishimaru 2013; Laffitte, Neiers, e Briand 2014). A maioria desses tecidos parece estar envolvida no metabolismo dos carboidratos onde o T1R2/T1R3 está relacionado com a deteção de nutrientes, monitorizando as alterações no armazenamento de energia e desencadeando as respostas metabólicas e comportamentais necessárias para manter o equilíbrio energético (A. Lee e Owyang 2017). Para além disto, a vasta expressão do T1R2/T1R3 a nível extraoral leva a destacar os potenciais riscos à saúde que os adoçantes representam, devido aos seus múltiplos alvos no organismo, nos quais foi proposto regular os seus processos metabólicos. Assim, este papel reconhecido do T1R2/T1R3 torna este recetor um potencial alvo terapêutico para o tratamento da obesidade e disfunções metabólicas relacionadas, como diabetes e a hiperlipidemia (Laffitte, Neiers, e Briand 2014). Mais especificamente, a expressão extraoral dos recetores do sabor doce já foi descrita no trato gastrointestinal, particularmente no estômago, intestino delgado e cólon, pâncreas, fígado, bexiga, tecidos adiposos, coração, testículos, trato respiratório, músculo esquelético, rins e cérebro, particularmente no hipotálamo, hipocampo, córtex e plexo coroide (Bezencon, le Coutre, e Damak 2007; Young et al. 2013; Taniguchi 2004; Elliott, Kapoor, e Tincello 2011; Masubuchi et al. 2013; Wauson et al. 2012; Gong et al. 2016; R. J. Lee e Cohen

2014; Kokabu et al. 2017; Rajkumar et al. 2014; Ren et al. 2009; Tomás et al. 2016). A figura 5 e os parágrafos seguintes apresentam as principais descobertas sobre a expressão extraoral do T1R2/T1R3 e o conhecimento sobre sua função nessas estruturas.



**Figura 5 - Sinalização através do recetor T1R2/T1R3 em células tipo II nas papilas gustativas, no intestino e nas células β do pâncreas.** A. Nas papilas gustativas, o T1R2/T1R3 ativado interage com proteínas G heterotrímicas compreendendo α-gustducina, Gβ3 e Gγ13. Depois da dissociação das subunidades da proteína G, a subunidade Gβγ interage com a fosfolipase C β2, que por sua vez cliva o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato em inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), produzindo diacilglicerol. O IP<sub>3</sub> estimula a libertação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático (ER), que ativa o membro 5 da subfamília M dos canais recetores de potencial transitório (TRPM5), levando à despolarização da membrana, que possibilita a abertura do canal de adenosina trifosfato (ATP), Pannexina-1 (Px-1) a libertar ATP, estimulando as fibras nervosas eferentes. B. No intestino, a via de transdução de sinal é semelhante ao descrito nas papilas gustativas. A estimulação da glucose (Glc) do recetor T1R2/T1R3 desencadeia a secreção de duas incretinas (GLP-1 e GIP), e aumenta a expressão do co-transportador de sódio-glucose 1 (SGLT-1) para a membrana plasmática. C. Nas células β do pâncreas, a Glc é transportada pelo transportador de glucose 2 (GLUT-2). A glicólise leva a um aumento de ATP, levando ao fecho do canal K<sub>ATP</sub>, o que causa despolarização. Essa despolarização, por sua vez, ativa o canal de cálcio (VDCC), levando à acumulação de Ca<sup>2+</sup> no citoplasma e à secreção de insulina, o que pode indicar que o recetor T1R2/T1R3 está envolvido na regulação da secreção de insulina. Adaptado de Laffitte, Neiers, e Briand 2014.

A crescente procura por adoçantes não nutritivos ocorre devido ao crescente interesse em saúde e envelhecimento da população, bem como em tornar as dietas limitadas mais agradáveis, levou a uma alteração do interesse para adoçantes naturais (Duffy and

Anderson, 1998). De entre muitos adoçantes naturais, sabe-se que esteviosídeo e rebaudiosídeo são agonistas do recetor do sabor doce e TRPM5, regulando a secreção de insulina (Laffitte, Neiers, e Briand 2014; Philippaert et al. 2017).

Num estudo efetuado numa linha celular enteroendócrina humana com elevada expressão de recetores do sabor doce, demonstrou-se que, após estímulo com glucose ou sacarose, as células libertavam o péptido semelhante a glucagon 1 (Jang et al. 2007; Park e Song 2019). O recetor do sabor doce estimula a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas através da ativação da fosfolipase C e da adenilato ciclase, levando à acumulação de  $Ca^{2+}$  no citoplasma e à secreção de insulina (Henquin, 2012; Laffitte, Neiers, e Briand 2014) (Tabela 1). Sob condições hiperglicémicas, a expressão intestinal do recetor T1R2 é regulada mutuamente pela glucose luminal em pacientes saudáveis, mas não em pacientes diabéticos (Young et al. 2013).

A expressão do recetor do sabor doce foi observada na membrana celular do urotélio humano, mais especificamente em células *umbrella*. Adoçantes artificiais como sacarina e acesulfame-k aumentam a contração do músculo detrusor da bexiga através da ativação das subunidades T1R2 e T1R3 (Elliott, Kapoor, e Tincello 2011) (Tabela 1). No duodeno, o nível de expressão do recetor do sabor doce mostrou ser regulado pelos níveis de glucose luminais e sistémicos, estando desregulado em pacientes com diabetes tipo 2 (Young et al. 2013). De acordo com Foster *et al.*, a existência da subunidade T1R3 no coração de roedores e humanos é responsável pela deteção de nutrientes (Foster et al. 2013). No cérebro de mamíferos, a existência do recetor do sabor doce no hipotálamo, hipocampo e córtex sugere que o mesmo funciona como sensor da glucose cerebral, e que pode estar envolvido na homeostase da glucose cerebral (Ren et al. 2009; Shin et al. 2010; Herrera Moro Chao et al. 2016). Em ratinhos machos, com *double-knockout* para T1R3 e  $\alpha$ -gustaducina, expressando o T1R3 humano transgénico, o seu bloqueio com o análogo do lactisole (clofibrato) induziu infertilidade e alterações patológicas nos órgãos reprodutivos. Contudo, em humanos, a expressão de T1R3 e  $\alpha$ -gustaducina, mas não de T1R2, foi observada em espermatozoides e órgãos reprodutores masculinos (Meyer et al. 2012; Mosinger et al. 2013). Além disso, o *knockout* do gene T1R2 reduziu as respostas neurais a estímulos doces e umami, e induziu um défice na aprendizagem e memória em porquinhos-da-índia (Kochem 2017; Behrens e Meyerhof 2019).

É de notar que os recetores do sabor doce e do amargo não coexistem em células extraorais, porém a sua coexistência foi demonstrada em células quimiossensoriais solitárias do trato respiratório, onde parecem atuar de forma antagónica na regulação

da imunidade inata (R. J. Lee et al. 2014). De facto, a ativação dos recetores de sabor amargo leva a um aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular, provocando a libertação de péptidos antimicrobianos. Por outro lado, a ativação das subunidades T1R2/T1R3, por exemplo através da glucose, inibe esse efeito (Maina, Workman, e Cohen 2018) (Tabela 1). Adicionalmente, a glucose na superfície líquida das vias aéreas é capaz de ligar ao recetor do sabor doce e consequentemente inibir a depuração mucociliar, tendo um impacto negativo em pacientes com diabetes ou rinosinusite crónica o que poderá influenciar o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos (Hatten et al. 2015; Carey e Lee 2019). Por exemplo, um spray nasal de lactisole foi proposto para atuar através do antagonismo T1R2/T1R3 no tratamento da rinosinusite crónica (Carey e Lee 2019).

**Tabela 1** – Função e expressão extraoral em órgãos/tecidos do recetor do sabor doce (T1R2/T1R3).

Recetor	Órgão/Tecido	Expressão	Função	Referências
T1R2/ T1R3	Intestino delgado	Células endócrinas	Secreção de GLP-1 e GIP	Jang et al. 2007; Henquin 2012
	Pâncreas	Células $\beta$ -pancreáticas	Libertação de insulina	Young et al. 2013
	Fígado	Ductos biliares	Monitorização de mudanças no suco biliar	Taniguchi 2004
	Bexiga	Músculo detrusor	Contração do músculo liso	Zhai et al. 2016
	Vias aéreas	Células quimiosensoriais solitárias	Inibição da secreção de péptidos antimicrobianos	Maina, Workman, e Cohen 2018

### **1.3.4 Expressão do recetor do sabor doce no cancro**

Como referido anteriormente, o paladar é responsável pela deteção e ingestão de alimentos de modo a cobrir as necessidades energéticas. A ocorrência de uma mudança na perceção do sabor pode potencializar a desnutrição, uma das causas mais frequentes de morbilidade e mortalidade em pacientes com cancro (Murtaza et al. 2017).

A glucose desempenha um papel importante em situações patológicas, como em tumores e isquemia. Num estudo de Grobбен, De Deyn, e Slegers, concluiu-se que poderão existir correlações entre os T1Rs e estas patologias, isto é, os T1Rs poderão ter um papel importante no desenvolvimento da tumorigénese cerebral (Grobбен, De Deyn, e Slegers 2002).

De acordo com a literatura, as subunidades T1R2/T1R3 demonstraram ser expressas em linhas celulares humanas de carcinoma colorretal, em células humanas tumorais gástricas parietais, em células humanas de adenocarcinoma do pâncreas, em cancro da cabeça e pescoço, e na linha celular humana de carcinoma intra-hepático do ducto biliar, embora nesta última linha celular apenas tenha sido confirmada a expressão da subunidade T1R3 (Jang et al. 2007; Toyono et al. 2007; Tsutsumi et al. 2016; Zopun, Liszt, et al. 2018; Shil et al. 2020; Gezginci-Oktayoglu et al. 2021)

### **1.3.5 Lactisole**

O lactisole é um ácido araquilcarboxílico, composto por um grupo carboxilo e um grupo fenoxil hidrofóbico, cuja principal característica é suprimir a perceção dos sabores doce e umami. O seu efeito inibitório é específico para humanos, não afetando as respostas a compostos doces por parte de roedores (Sclafani e Pérez 1997). Adicionalmente, a ação do lactisole tem como alvo a subunidade T1R3 humana, pois apenas é capaz de se ligar ao domínio transmembranar T1R3-TMD (Xu et al. 2004; Jiang, Cui, Zhao, Liu, et al. 2005). Para além disso, o grupo carboxilo e o anel aromático presentes na estrutura do lactisole são necessários para que ocorra a supressão do sabor doce (Jiang, Cui, Zhao, Liu, et al. 2005).

Um estudo mais aprofundado com o intuito de estudar o local de interação do lactisole com o T1R3, demonstrou que este inibidor competitivo e não competitivo requer o domínio C-terminal do T1R3 humano através da sua interação com 7 resíduos do T1R3-TMD (Xu et al. 2004). Em particular, os resíduos His641<sup>3-37</sup> e Gln794<sup>7-32</sup> são os mais importantes na interação com o grupo carboxilo do inibidor (Nakagita et al. 2019). É de

salientar que, em humanos, o lactisole inibe a perceção de muitos, mas não todos os adoçantes (Schiffman 1999).

Deste modo, de acordo com a literatura, verificámos que o recetor do sabor doce se encontra expresso em vários tecidos extraorais e em linhas celulares de alguns tipos de cancro, assim pretende-se realizar a sua inibição, mais especificamente da subunidade T1R3, com lactisole, em linhas celulares de glioblastoma, cancro da mama e cancro colorretal, com o intuito de verificar se este recetor poderá ser um potencial alvo na terapia clínica.

## Capítulo 2

### Objetivos

Recentemente, o nosso grupo de investigação identificou a existência de recetores do paladar, mais especificamente do recetor do sabor doce, em linhas celulares humanas de glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG). Adicionalmente, a inibição deste recetor nas células de glioblastoma demonstrou ter resultados promissores na diminuição da viabilidade das células tumorais, existindo a necessidade de realizar mais estudos, nomeadamente se o recetor do sabor doce também se encontra expresso noutros tipos de células tumorais.

Assim, o presente estudo tem como objetivo analisar a expressão e compreender o efeito do bloqueio do recetor do sabor doce, constituído pelas subunidades T1R2/T1R3, em linhas celulares de glioblastoma, cancro de mama e adenocarcinoma colorretal.

Mais especificamente, o presente trabalho tem como objetivos:

- Caraterizar a expressão do recetor do sabor doce, constituído pelas subunidades T1R2/T1R3, em linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e colorretal (Caco-2);
- Determinar o efeito do bloqueio, com lactisole, da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce na proliferação celular, migração, apoptose e *uptake* da glucose nas linhas celulares de glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG), cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2).



## Capítulo 3

### Material e Métodos

#### 3.1 Materiais e reagentes

O kit *Glucose Uptake Cell-Based Assay Kit* para as experiências de *uptake* da glucose e o composto lactisole (CAS 150436-68-3) foram adquiridos à Cayman Chemical. Uma solução stock de 0.8 M de lactisole foi preparada em dimetilssulfóxido (DMSO), e dissolvida em meio de cultura imediatamente antes da realização de cada experiência, nas quais a concentração final de DMSO não excedeu 0.5%. O MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] foi adquirido à Gerbu Biotechnik GmbH. O kit *CellEvent™ Caspase-3/7 Green* foi adquirido à Thermo Fisher Scientific. Para a imunocitoquímica, os anticorpos primários anti-T1R2 e -T1R3 foram adquiridos à Santa Cruz Biotechnology, e os anticorpos secundários Alexa Fluor® 488 *goat anti-rabbit* e Alexa Fluor® 647 *rabbit anti-goat* foram adquiridos à Thermo Fisher Scientific.

#### 3.2 Cultura celular

Neste trabalho, foram utilizadas três linhas celulares de glioblastoma U-87MG, SNB-19 e U-373MG, a linha celular de cancro da mama MCF-7, e a linha celular de cancro colorretal Caco-2.

As linhas celulares de glioblastoma foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contendo 4,5 g/L de glucose (*high glucose*; HG) com glutamina estável (BioWest) suplementado com 10% de Soro Fetal de Bovino (FBS) e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina. As células MCF7 de cancro da mama foram mantidas em meio de cultura DMEM:F-12 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% FBS e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina. A linha celular Caco-2 de adenocarcinoma colorretal foi mantida em meio de cultura DMEM HG (Gibco) suplementado com 10% FBS, 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina e 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco). Todas as linhas celulares foram incubadas a 37°C e uma atmosfera de 95% Ar e 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada 24-48h.

### 3.2.1 Passagem celular

Para expansão das linhas celulares, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas com PBS 1x (*phosphate buffered saline*). De seguida, o PBS 1x foi aspirado e adicionado 1 mL de 0,25% tripsina/EDTA durante 3-5 minutos a 37°C. Após as células se encontrarem soltas da superfície à qual estão aderidas, foi adicionado 1 mL de meio de cultura ao frasco de cultura. Posteriormente transferiu-se a suspensão celular para um tubo tipo *falcon* de 15 mL e centrifugou-se durante 3 minutos a 1300 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura. Finalmente, parte da ressuspensão celular foi retirada para um frasco novo previamente preparado com 3-5 mL de meio de cultura após contagem do número de células.

### 3.2.2 Contagem celular

Para realizar a contagem das células, retiraram-se 10 µL da suspensão celular, após tripsinização conforme descrito na secção anterior, para um tubo tipo *eppendorf* e aos quais se adicionaram 10 µL de 0,4 % azul tripano. De seguida, 10 µL desta mistura foram colocados numa das extremidades de uma câmara de *Neubauer* e procedeu-se à contagem e estimativa do número de células usando as seguintes fórmulas:

$$N^{\circ} \frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \text{Média de células}_{\text{quadrantes}} \times 2 \times 10^4 \quad (1)$$

$$N^{\circ} \text{ Total Células} = N^{\circ} \frac{\text{Células}}{\text{ml}} \times V_{\text{ressuspensão celular}} \quad (2)$$

Posteriormente, procedeu-se ao cálculo do número de células necessário para os ensaios experimentais.

### **3.3 Expressão génica do recetor do sabor doce**

#### **3.3.1 Análise de dados de *microarrays***

Como referido anteriormente, o nosso grupo de investigação identificou recentemente a presença do recetor do sabor doce em três linhas celulares humanas de glioblastoma. No seguimento deste trabalho, procedeu-se a uma análise inicial de dados transcriptómicos disponíveis para as linhas celulares de cancro de mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2). Para tal, analisaram-se dados de *microarrays* provenientes do repositório de dados genómicos *Gene Expression Omnibus* (GEO), obtidos de séries que caracterizaram perfis de expressão de mRNA em diferentes linhas celulares de cancro, incluindo MCF7 (GSE13598, GSE77606; GSE133134; e GSE159661) e Caco-2 (GSE13598, GSE77606; GSE46549; GSE97023).

Resumidamente, realizou-se uma pesquisa pelos genes T1R2 e T1R3 nas bases de dados, e os valores médios de expressão foram calculados para todas as amostras de MCF7 (N=4) e Caco-2 (N=4). A validação destes dados foi posteriormente confirmada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e imunocitoquímica nas linhas celulares em estudo.

#### **3.3.2 Extração de RNA total e tratamento com DNase I**

Para a realização da extração do RNA total das células MCF7 e Caco-2 foi utilizado o kit *RNeasy Micro* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Aos *pellets* de células foram adicionados 350 µL de tampão RLT seguido de homogeneização, de forma a provocar o rompimento das células e a dissolução dos componentes celulares. De seguida, adicionou-se 1 volume de etanol 70% e homogeneizou-se. Posto isto, as amostras foram transferidas para uma coluna *RNeasy MinElute spin* num tubo coletor de 2 mL e centrifugação durante 15 segundos a 8000 g. Adicionaram-se 350 µL de tampão RW1 centrifugou-se novamente durante 15 segundos a 8000 g. Posteriormente, foram adicionados 80 µL de DNase I diretamente na membrana da coluna seguido de incubação de 15 minutos. Adicionou-se mais uma vez tampão RW1 e centrifugou-se durante 15 segundos a 8000 g. Por fim, foram adicionados 500 µL de tampão RPE à coluna e centrifugou-se durante 15 segundos a 8000 g. Seguidamente, foram acrescentados à coluna 500 µL de etanol 80% e as amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a 8000 g. Finalmente, as amostras foram centrifugadas à velocidade máxima durante 5 minutos, a coluna foi colocada num tubo de 1,5 ml, e adicionaram-se 14 µL de água *RNase-free*. De forma a eluir o RNA retido na coluna, centrifugaram-se

as amostras durante 1 minuto à velocidade máxima. Por fim, armazenaram-se as amostras a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.3 Quantificação do RNA total

A quantificação de RNA total foi realizada num nanoespectrofotómetro (Nanophotometer™, Implen), por medição das absorvâncias a 260nm (A260). Adicionalmente, mediram-se as absorvâncias a 280nm (A280), permitindo calcular a razão A260/A280, que indica o grau de pureza do RNA. Considera-se que o RNA está puro quando a razão entre as absorvâncias se encontra no intervalo entre 1,8 e 2,1.

### 3.3.4 Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) é sintetizado através de uma reação enzimática no RNA, realizada pela ação da transcriptase reversa, que permite obter uma cadeia dupla de DNA complementar à sequência de RNA. Utilizou-se a enzima *NZY M-MuLV Reverse Transcriptase* (NZYTech, Portugal), seguindo as instruções do fabricante.

Por cada amostra preparou-se uma MIX num microtubo contendo 1 µg de RNA, 2 µL de *random primers* e 1 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), e incubou-se num termociclador durante 5 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . Após incubação, adicionaram-se às amostras 2 µL de tampão RT e 1 µL de Transcriptase Reversa NZY M-MuLV. Os microtubos foram colocados no termociclador e incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos,  $37^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos e por último a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. O cDNA foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

### 3.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O método de Reação em Cadeia da Polimerase permite amplificar uma sequência específica de DNA através da utilização de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), sendo cada um deles complementar a cada uma das extremidades da sequência a amplificar. Utilizou-se a técnica de PCR para analisar a expressão dos genes que codificam as subunidades T1R2 e T1R3 que constituem o recetor do sabor doce nas linhas celulares de cancro da mama MCF7 e cancro colorretal Caco-2.

De forma a amplificar os cDNAs dos genes em estudo, utilizou-se a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYtech, Portugal) segundo as instruções do fabricante. Para obter um volume final de 10 µL por cada reação adicionaram-se 5 µL de *NZYTaq II 2x Green Master Mix*, 0,3 µL de *primer forward* (10 µmol), 0,3 µL de *primer reverse* (10 µmol) e 3,2 µL de água estéril. Por fim, a cada reação foi adicionado 1 µL de cDNA, à

exceção do controlo negativo ao qual foi adicionado 1 µL de água estéril. A amplificação foi realizada num termociclador de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos de forma a desnaturar o DNA, 45 segundos na temperatura ótima (60°C) para o emparelhamento dos *primers*, e 30 segundos a 72°C para a polimerização, e finalmente a 72°C por 5 minutos para extensão final.

Os *primers forward* e *reverse* (Tabela 2) utilizados foram desenhados através da ferramenta *Primer-BLAST* do NCBI-NIH.

**Tabela 2** – Sequência dos *primers* utilizados.

Gene	Tamanho do fragmento	Sequência de <i>primers</i>	Temperatura de hibridação
T1R2	119 bp	<i>Fw</i> : 5'-CTCGGCTGTGACAAAAGCAC-3' <i>Rv</i> : 5'-CCTTGCGGGTCGAAGAAGAT-3'	60 °C
T1R3	173 bp	<i>Fw</i> : 5'-GACAGAGCGCCTGAAGATCC-3' <i>Rv</i> : 5'-CGATGTCGTCTGGGTTTTGC-3'	60 °C

Bp: pares de bases; *Fw*: *forward*; *Rv*: *reverse*

### 3.4 Imunocitoquímica

A presença das proteínas das subunidades T1R2 e T1R3 nas linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2) foi confirmada por imunocitoquímica de fluorescência. Resumidamente, as células foram semeadas em lamelas de 10 mm e incubadas a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de 60-70%. Depois de descartar o meio de cultura, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com 4% paraformaldeído (PFA) durante 10 minutos, seguidas de 1 hora de bloqueio à temperatura ambiente numa solução de PBS 1x contendo 3% albumina de soro bovino (BSA) e 0.2% Triton X-100. Posteriormente, as células foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários anti-T1R2 ou anti-T1R3 diluídos 1:100 numa solução de diluição de anticorpos contendo 1% BSA e 0.1% Tween-20 em PBS 1x. Nos controlos negativos, os anticorpos primários foram omitidos. As células foram depois lavadas diversas vezes com PBS 1x contendo 0.1% de Tween-20 (PBS-T) e incubadas durante 1 hora com os anticorpos secundários Alexa Fluor® 488 *goat anti-rabbit* ou Alexa Fluor® 647 *rabbit anti-goat* diluídos 1:1000 na solução de diluição de anticorpos. Finalmente, as lamelas contendo as células foram incubadas durante 10 minutos com o marcador de núcleos *Hoechst 33342* diluído 1:1000 em PBS-T. Depois de várias lavagens, as lamelas

foram montadas em lâminas, e visualizadas num microscópio confocal LSM 710 (Zeiss).

### 3.5 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de MTT foi realizado com o objetivo de analisar o efeito da inibição, com lactisole, da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce na viabilidade celular. Este ensaio consiste na conversão de MTT em formazano sob a forma de cristais cor púrpura, através de uma reação de redução, sendo a quantidade de formazano formado medida por espectrofotometria.

Para a realização deste ensaio, semearam-se células de glioblastoma, cancro da mama e cancro colorretal das cinco linhas celulares em estudo, posteriormente incubadas a 37°C + 5% CO<sub>2</sub>. Quando as células atingiram uma confluência de 50-60%, procedeu-se à adição do estímulo de 5 mM de lactisole durante 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, nas seguintes condições: branco, controlo positivo, HG (células em meio de cultura contendo 4,5 g/L glucose) e HG + lactisole. Após 48h, adicionaram-se 50 µL de etanol 100% ao controlo positivo e incubou-se durante 5-10 minutos. A partir deste ponto, o meio de cultura foi descartado, adicionaram-se 50 µL de MTT a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C + 5% CO<sub>2</sub>, durante 2-4 horas. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL de DMSO a cada poço e agitou-se a placa durante 30 minutos. Por último, transferiram-se 80 µL da solução com os cristais bem dissolvidos para uma nova placa de 96 poços e procedeu-se à leitura da absorvância a 570 nm num espectrofotómetro xMark (Bio-Rad). A percentagem de viabilidade celular das diferentes condições relativamente ao controlo (HG) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs\ Amostra - Média\ Abs\ Branco}{Média\ Abs\ Controlo - Média\ Abs\ Branco} \times 100 \quad (3)$$

### 3.6 Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular foi realizado com o intuito de analisar o efeito da inibição, com lactisole, da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce na migração das linhas celulares de glioblastoma, cancro da mama e cancro colorretal.

Para tal, semearam-se aproximadamente 100.000 células em placas de 12 poços e incubaram-se a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de 90-100%. Em seguida, foi criado um *scratch* em cada poço, raspando uma linha reta com uma ponta de micropipeta. Os detritos e meio de cultura foram descartados, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, e adicionou-se meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole. Em seguida, as placas foram fotografadas num microscópio invertido Axio Observer Z1 (Zeiss) às 0, 24 e 48 horas após estímulos para posterior análise quantitativa. Para cada imagem, as distâncias entre as células separadas pelo *scratch* foram medidas no software Fiji, e calculadas segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de Migração (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{Área 24 hou 48h}}{\text{Área 0h}} \times 100 \right) \quad (4)$$

### 3.7 Ensaio da apoptose celular

A apoptose celular é uma forma de morte celular caracterizada pela perda da integridade membranar e alterações no núcleo. Deste modo, este ensaio foi realizado com o intuito de verificar se tal processo ocorre após inibição, com lactisole, da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce das cinco linhas celulares em estudo.

Para a realização deste ensaio, utilizou-se o kit *CellEvent™ Caspase-3/7 Green* e marcação com iodeto de propídio. As células U-87MG, SNB-19, U-373MG, MCF7 e Caco-2 foram semeadas em lamelas de 10 mm e incubadas a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de 60-70%. Quando as células atingiram a confluência desejada, procedeu-se à adição dos estímulos HG na presença ou ausência de 5 mM de lactisole, ou 1 µM de staurosporine (controlo positivo de apoptose) e foram incubadas a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Após incubação, foram adicionados os reagentes *CellEvent* (5 µM) e iodeto de propídio (1:1000) e incubaram-se novamente as células a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Depois de descartar o meio de cultura, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com 4% PFA durante 10 minutos, seguidas de incubação de 10 minutos à temperatura ambiente com o marcador nuclear *Hoechst*

33342 diluído 1:1000. Posto isto, as lamelas foram montadas em lâminas e visualizadas num microscópio Axio Imager Z2 (Zeiss).

### 3.8 Ensaio de consumo da glucose

O ensaio de consumo da glucose foi realizado com o intuito de determinar a quantidade de glucose absorvida pelas células de glioblastoma SNB-19, através de um marcador fluorescente análogo da desoxiglucose (2-NBDG).

Para a realização deste ensaio, utilizou-se o kit comercial *Glucose Uptake Cell-Based Assay Kit*. Resumidamente, aproximadamente 20.000 células SNB-19 foram semeadas em placas de 96 poços pretas de fundo transparente, e incubaram-se *overnight* a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> em meio de cultura HG. Seguidamente, o meio de cultura foi descartado e as células foram sujeitas a privação de glucose, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole. Após 4 horas de incubação a 37°C + 5% CO<sub>2</sub>, adicionaram-se 100 µg/mL de 2-NBDG a cada poço, tendo-se incubado novamente a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. De seguida, o meio de cultura foi descartado, as células foram lavadas com *cell-based assay buffer* e centrifugadas a 400 g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se uma solução de *Hoechst 33342* diluído 1:1000 em *cell-based assay buffer*, para marcação dos núcleos das células, e centrifugou-se novamente a 400 g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado *cell-based assay buffer*. Por último, procedeu-se à leitura de fluorescência do *Hoechst 33342* a comprimentos de onda de excitação/emissão 361/497 nm e da fluorescência da glucose 2-NBDG a 485/535 nm num espectrofluorímetro SpectraMax Gemini (Molecular Devices). O *uptake* de glucose foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$Uptake\ glucose = \frac{Fluorescência - Branco\ NBDG}{Fluorescência - Branco\ Hoechst\ 33342} \quad (5)$$

### **3.9 Análise estatística**

A análise estatística para comparações entre os diferentes grupos foi realizada no programa *GraphPad Prism*. As significâncias estatísticas de comparação entre dois grupos foram determinadas utilizando o teste *t* de *Student*, e a comparação de médias entre três ou mais grupos foi determinada utilizando a análise ANOVA seguida de um teste de comparações múltiplas recomendado pelo software. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  SEM, e considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .



## Capítulo 4

### Resultados

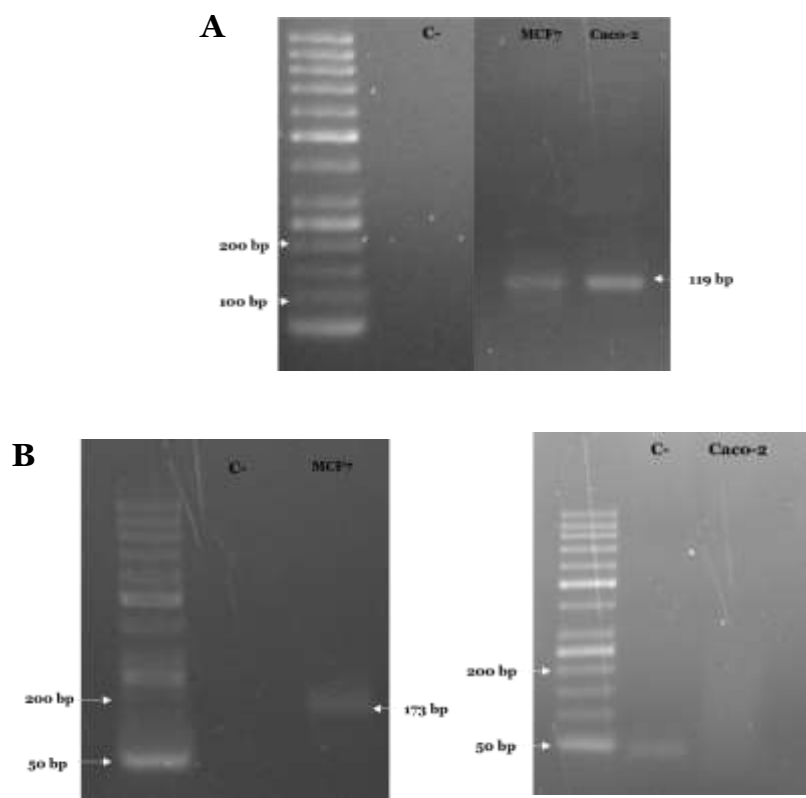
#### 4.1 Expressão génica do recetor do sabor doce

De forma a analisar a expressão génica do recetor do sabor doce nas linhas celulares de cancro de mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2), começou-se por investigar a presença das subunidades T1R2 e T1R3 obtidos de estudos de *microarrays* para estas células, em bases de dados do repositório GEO (Tabela 3). Os níveis médios de expressão das subunidades T1R2 e T1R3 que constituem o recetor do sabor doce nas bases de dados analisadas foram semelhantes em ambas as linhas celulares, mas diferentes entre os dois tipos de cancro.

**Tabela 3** – Expressão das subunidades T1R2 e T1R3 nas linhas celulares de cancro de mama (MCF7) e de cancro colorretal (Caco-2), obtidos a partir de bases de dados de transcriptómica disponíveis no repositório GEO (*Gene Expression Omnibus*).

Gene	Cancro de Mama (MCF7)	Cancro colorretal (Caco-2)
T1R2	1.0193	2.7640
T1R3	1.9934	2.8846

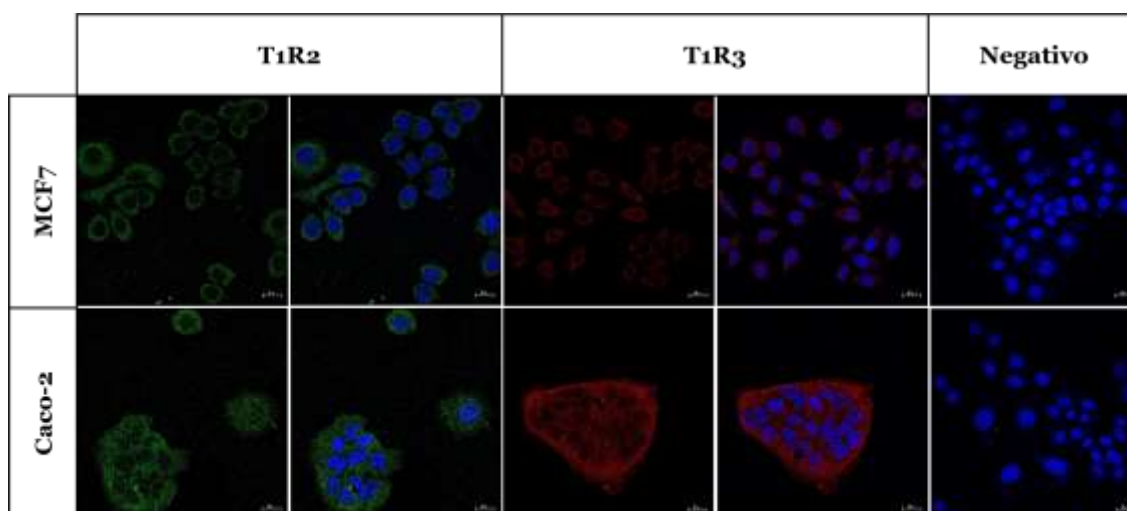
A expressão génica do recetor de sabor doce foi analisada através da expressão de mRNA dos genes das subunidades T1R2 e T1R3 nas linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2). As subunidades do recetor do sabor do doce já tinham sido previamente identificadas no glioblastoma, e conforme observado na Figura 6, ocorreu amplificação do gene T1R2 e do gene T1R3 também nas linhas celulares MCF7 e Caco-2 com o tamanho previsto de 119 e 173 pares de bases, respetivamente.



**Figura 6 – Eletroforese em gel dos produtos de PCR das subunidades (A) T1R2 e (B) T1R3 do recetor do sabor doce nas linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2).** Em cada uma das imagens encontra-se representado (da esquerda para a direita) o marcador de peso molecular, o controlo negativo (C-) e o fragmento relativo a cada linha celular. As bandas de T1R2 foram exibidas em 119 bp e as bandas de T1R3 foram exibidas em 173 pb nas linhas celulares em estudo. C-: controlo negativo sem cDNA. Bp: pares de bases.

## 4.2 Imunocitoquímica

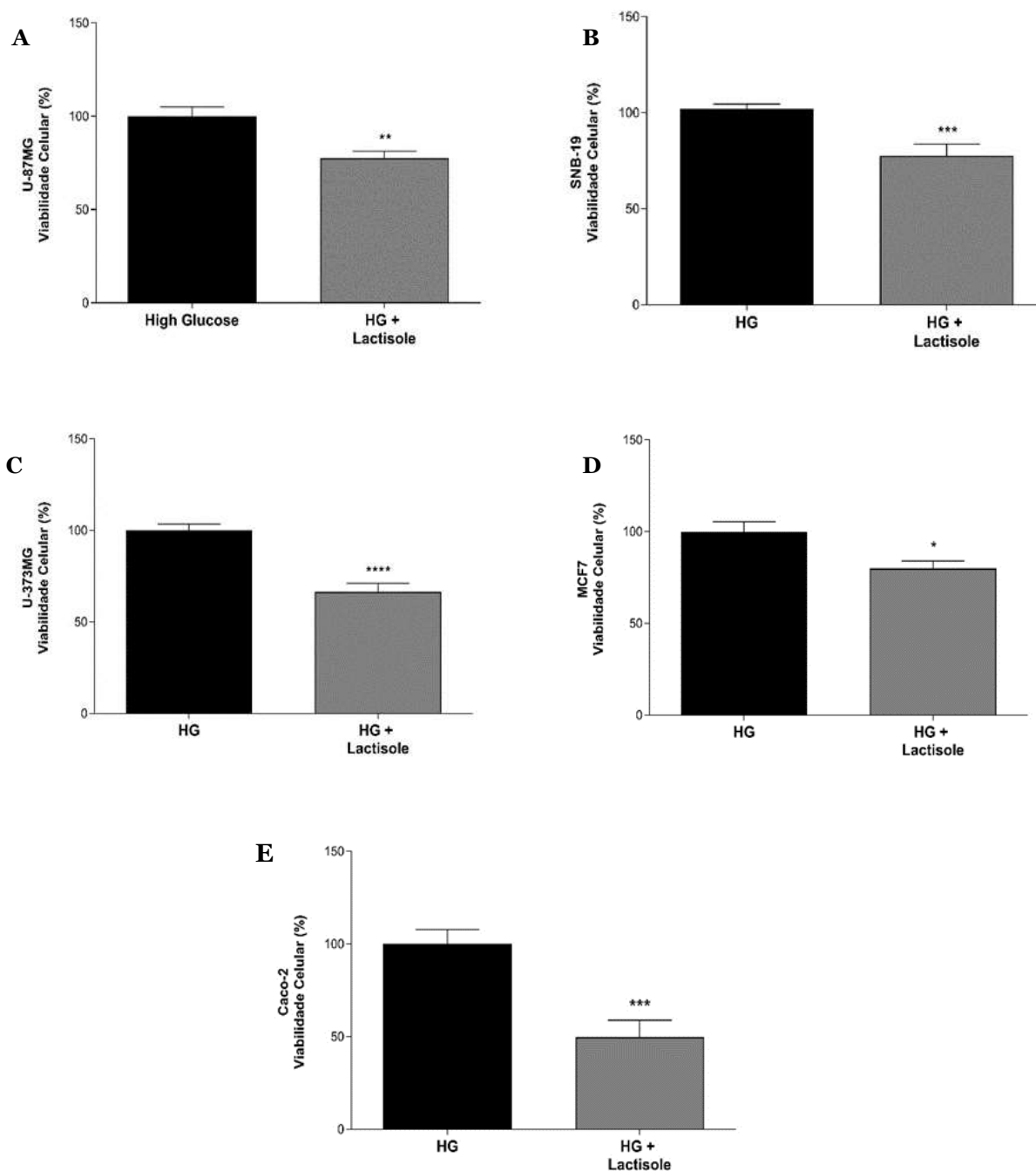
A realização deste ensaio permitiu confirmar a expressão das subunidades T1R2 e T1R3 nas linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e de cancro colorretal (Caco-2). Conforme pode ser observado na figura 7, as subunidades T1R2 e T1R3 encontram-se expressas ao redor do núcleo e na membrana citoplasmática das células em estudo.



**Figura 7 - Imagens representativas da expressão das subunidades T1R2 e T1R3 do recetor do sabor doce nas linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2).** Imagens obtidas por microscopia confocal, nas quais os núcleos foram marcados com Hoechst 33342 (azul), a subunidade T1R2 foi marcada com AlexaFluor® 488 (verde), e a subunidade T1R3 foi marcada com AlexaFluor® 647 (vermelho). Nos controlos negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Barra de escala = 20 µm.

### 4.3 Viabilidade celular

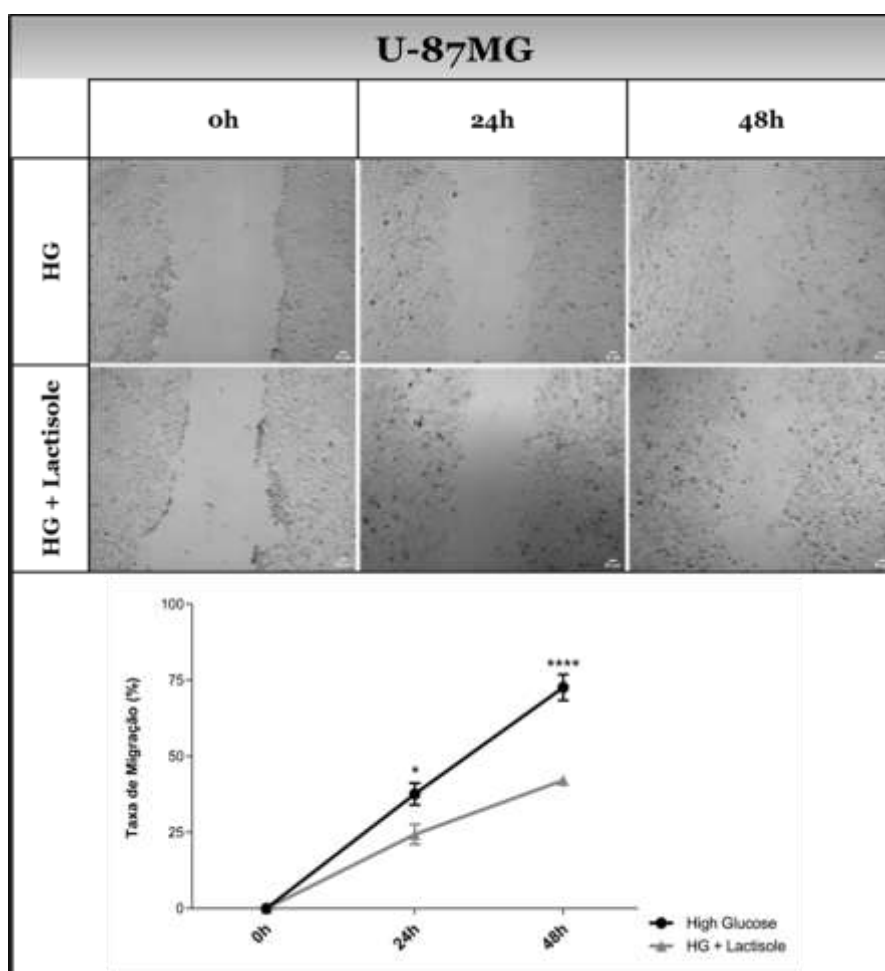
O ensaio de MTT foi realizado com o propósito de verificar o efeito do bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce com 5 mM de lactisole durante 48 horas na viabilidade das linhas celulares de glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG), cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2). No geral, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular em todas as linhas celulares estudadas (Figura 8). Mais especificamente, nas linhas celulares de glioblastoma, embora se tenham observado diferenças significativas na viabilidade celular das três linhas celulares em estudo, as células U-373MG apresentaram a maior diminuição da viabilidade (Figura 8C) e a linha celular U-87MG a menor diminuição da viabilidade celular (Figura 8A). É possível observar uma ordem crescente de diminuição de viabilidade nas linhas celulares de glioblastoma proporcional à sua capacidade proliferativa: U-87MG (23%), SNB-19 (23%) e U-373MG (34%), com os valores  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  e  $****p < 0.0001$ , respetivamente (Figuras 8A, 8B e 8C). Relativamente às células de cancro da mama MCF7 ( $*p < 0.05$ ), estas apresentaram a menor diminuição da viabilidade celular (20%; Figura 8D) comparativamente com as restantes linhas celulares em estudo. Para a linha celular de cancro colorretal Caco-2 ( $***p < 0.001$ ) verificou-se uma diminuição da viabilidade celular acentuada de aproximadamente 50% (Figura 8E).



**Figura 8 – Efeitos do bloqueio da subunidade T1R3 do recetor de sabor doce na viabilidade celular das linhas celulares de glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG), cancro da mama (MCF7) e cancro colorretal (Caco-2).** A percentagem de viabilidade celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole durante 48 horas, foi determinada através de ensaios MTT. (A) Linha celular de glioblastoma U-87MG; (B) Linha celular de glioblastoma SNB-19; (C) Linha celular de glioblastoma U-373MG; (D) Linha celular de cancro da mama MCF7; (E) Linha celular de cancro colorretal Caco-2. Para a análise estatística usou-se ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas recomendado, tendo-se considerado um resultado estatisticamente significativo quando  $p < 0.05$ . Os gráficos de barra apresentados representam as médias  $\pm$  SEM com um  $n=3$ . HG: *High glucose*. \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## 4.4 Migração celular

Para além da importância de avaliar se o bloqueio do recetor do sabor doce, mais especificamente da subunidade T1R3, afeta a proliferação celular, também se procedeu a ensaios de migração celular, uma importante característica das células cancerosas associada à capacidade invasiva dos tumores. À semelhança do ensaio de viabilidade celular, as linhas celulares de glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG), de cancro da mama (MCF7) e de cancro colorretal (Caco-2) foram incubadas com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole, e a taxa de migração medida às 0, 24 e 48h. As figuras 9-13 apresentam imagens representativas de cada condição e os gráficos da percentagem de taxa de migração das linhas celulares em estudo.

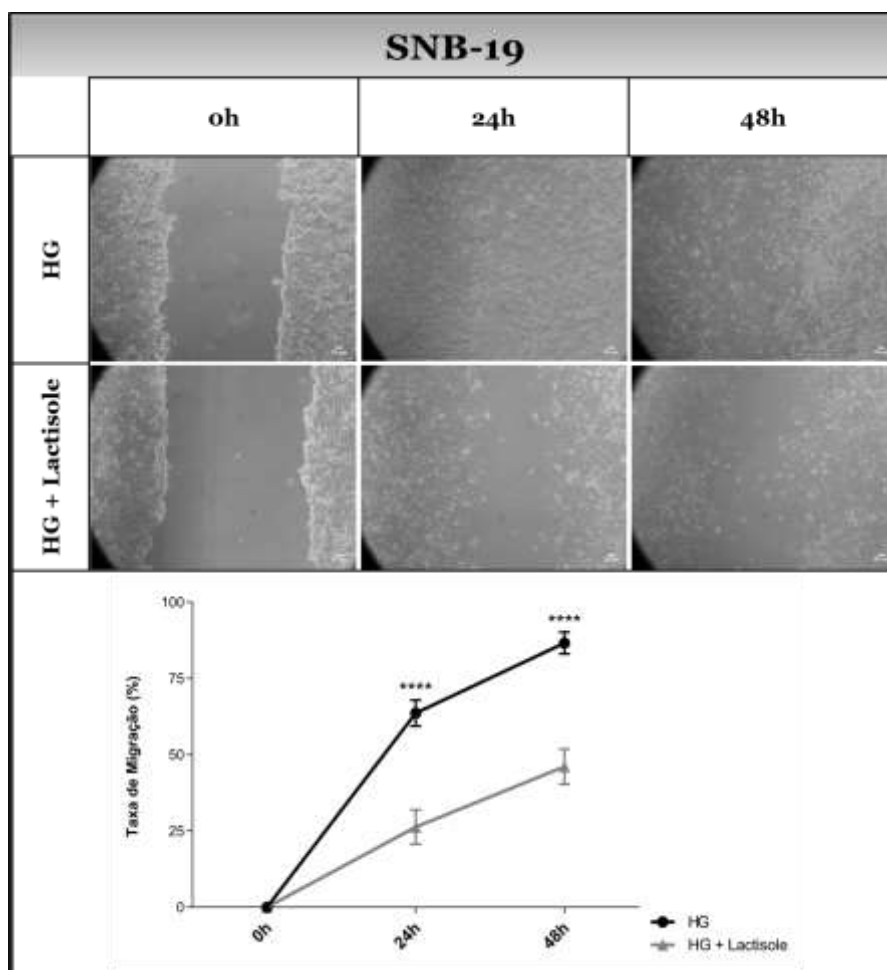


**Figura 9 - O bloqueio da subunidade T1R3 reduz a taxa de migração da linha celular de glioblastoma U-87MG.** (A) Imagens representativas da migração celular. (B) Taxa de migração das células. A taxa de migração celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole, foi medida às 0, 24 e 48 horas. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas recomendado, tendo-se considerado um resultado estatisticamente

significativo quando  $p < 0.05$ . Os gráficos de barra apresentados representam as médias  $\pm$  SEM com um  $n=3$ . HG: *High glucose*. \* $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Nas células de glioblastoma U-87MG, é possível observar (figura 9) que o grupo controlo (HG) migra a um ritmo mais rápido comparativamente ao grupo de células cujo recetor do sabor doce se encontrava inibido (HG + Lactisole).

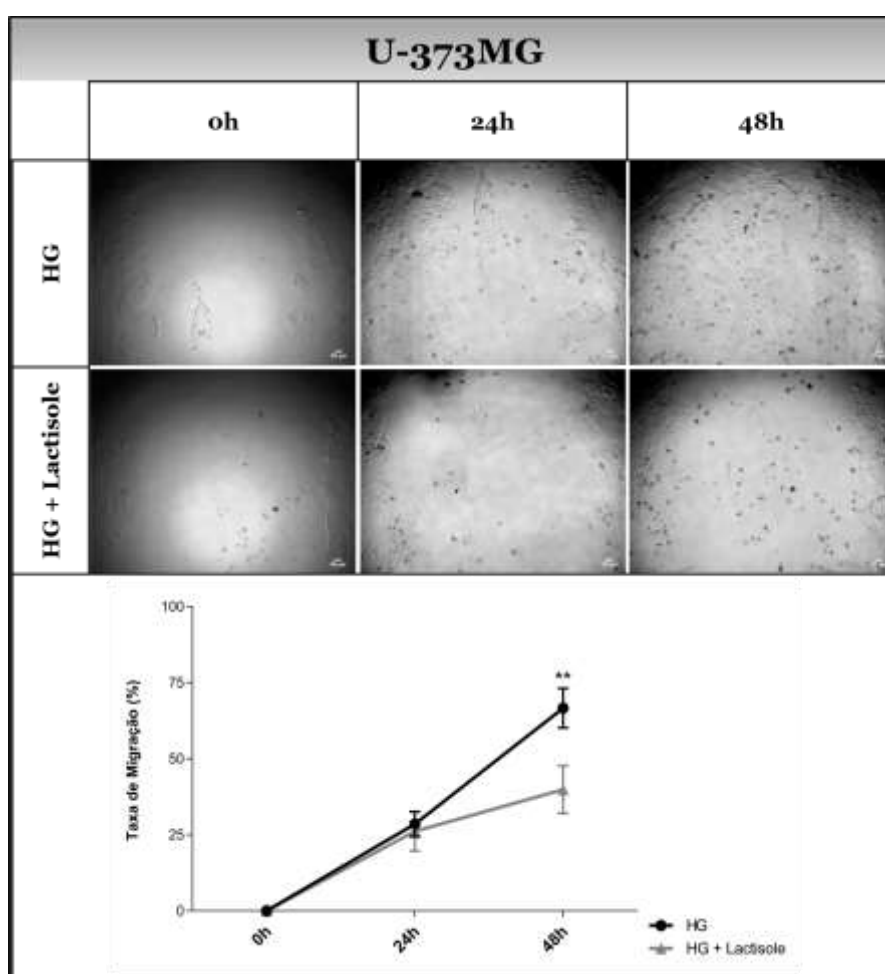
Assim, a inibição do recetor do sabor doce com lactisole mostrou ser eficaz em diminuir a capacidade das células de proliferar e migrar após 24 e 48 horas (\* $p < 0.05$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$ , respetivamente). Também foi possível observar que, após 24 horas, a taxa de migração do grupo controlo foi de aproximadamente 38%, tendo aumentado para aproximadamente 73% após 48 horas.



**Figura 10 - O bloqueio da subunidade T1R3 do reduz a taxa de migração da linha celular de glioblastoma SNB-19.** (A) Imagens representativas da migração celular. (B) Taxa de migração das células. A taxa de migração celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole, foi medida às 0, 24 e 48 horas. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas recomendado, tendo-se considerado um resultado estatisticamente significativo quando  $p < 0.05$ . Médias  $\pm$  SEM,  $n=4$ . HG: *High glucose*. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

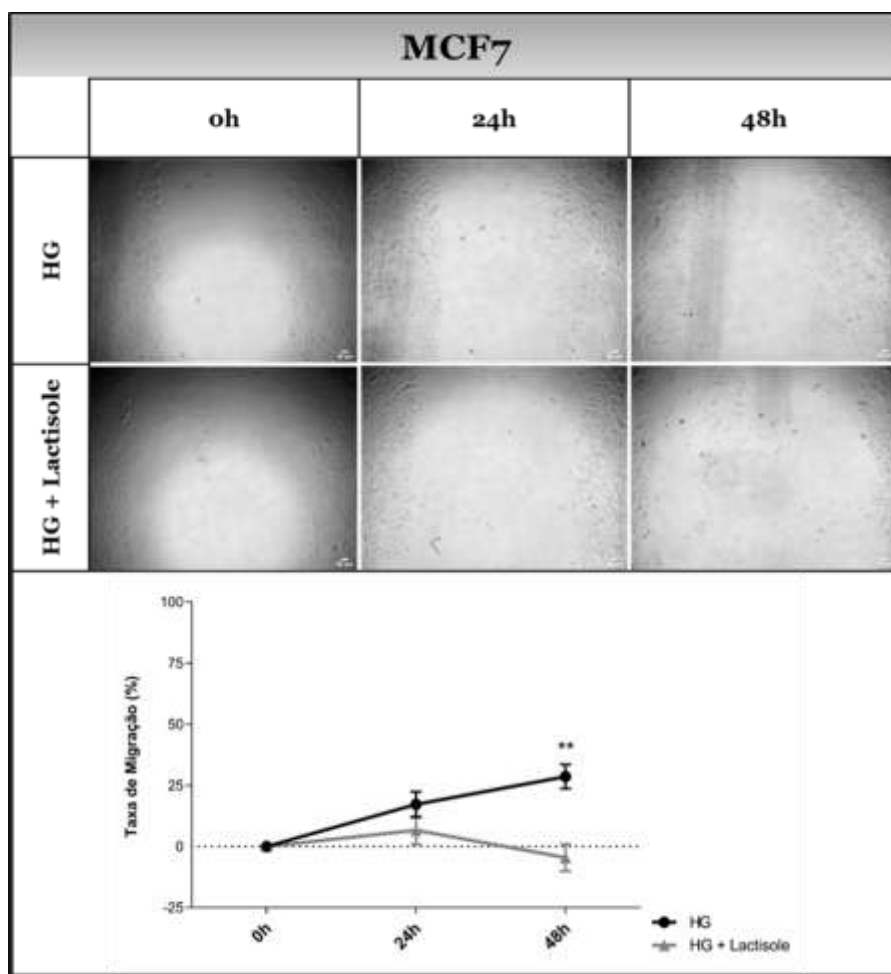
À semelhança das células U-87MG, também nas células de glioblastoma SNB-19 (Figura 10) se pode observar que o grupo de controlo (HG) migra a um ritmo mais rápido comparativamente ao grupo no qual o recetor do sabor doce foi inibido com lactisole (HG + Lactisole).

Deste modo, a inibição do recetor do sabor doce com lactisole mostrou ser eficaz em diminuir a capacidade das células de proliferar e migrar, tanto após 24h como após 48 horas (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Também é possível observar que, após 24 horas, a taxa de migração do grupo controlo foi de aproximadamente 64%, e após as 48 horas aumentou para aproximadamente 87%.



**Figura 11 - O bloqueio da subunidade T1R3 do do recetor de sabor doce reduz a taxa de migração da linha celular de glioblastoma U-373MG.** (A) Imagens representativas da migração celular. (B) Taxa de migração de migração das células. A taxa de migração celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole, foi medida às 0, 24 e 48 horas. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas recomendado, tendo-se considerado um resultado estatisticamente significativo quando  $p < 0.05$ . Médias  $\pm$  SEM,  $n=5$ . HG: *High glucose*. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

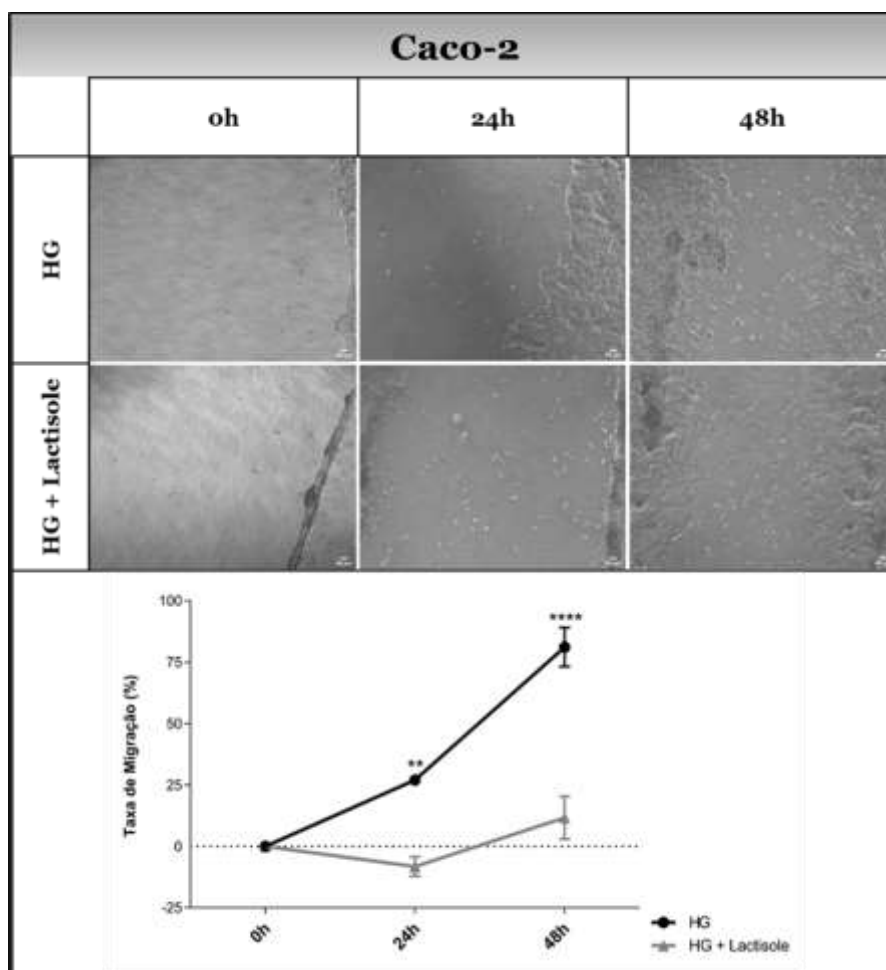
Nas células de glioblastoma U-373MG, apenas foi possível observar diferenças estatisticamente significativas na taxa de migração celular após 48 horas no grupo controlo relativamente às células com o recetor do sabor doce inibido (Figura 11). Assim, a inibição do recetor do sabor doce mostrou ser eficaz em diminuir a capacidade das células de proliferar e migrar após 48 horas (\*\*p<0.01). Após 24 horas, a taxa de migração do grupo controlo foi de aproximadamente 29%, e após as 48 horas aumentou acentuadamente para aproximadamente 67%.



**Figura 12 - O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor de sabor doce reduz a taxa de migração da linha celular de cancro da mama MCF7.** (A) Imagens representativas da migração celular. (B) Gráfico correspondente à taxa de migração. A taxa de migração celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole, foi medida às 0, 24 e 48 horas. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas recomendado, tendo-se considerado um resultado estatisticamente significativo quando p<0.05. Os gráficos de barra apresentados representam as médias ± SEM com um n=3. HG: *High glucose*. \*\*p<0.01. Barra de escala: 50 µm.

Nas células de cancro de mama MCF7, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na inibição do recetor do sabor doce com lactisole apenas após 48 horas de incubação (\*\*p<0.01; Figura 12). Após 24 horas, a taxa de migração do grupo

controlo foi de aproximadamente 17%, e após 48 horas aumentou para aproximadamente 29%.



**Figura 13 - O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor de sabor doce reduz acentuadamente a taxa de migração da linha celular de cancro colorretal Caco-2.** (A) Imagens representativas da migração celular. (B) Gráfico correspondente à taxa de migração. A taxa de migração celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole, foi medida às 0, 24 e 48 horas. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas recomendado, tendo-se considerado um resultado estatisticamente significativo quando  $p < 0.05$ . Médias  $\pm$  SEM,  $n=3$ . HG: *High glucose*. \*\* $p < 0.01$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Barra de escala: 50  $\mu$ m.

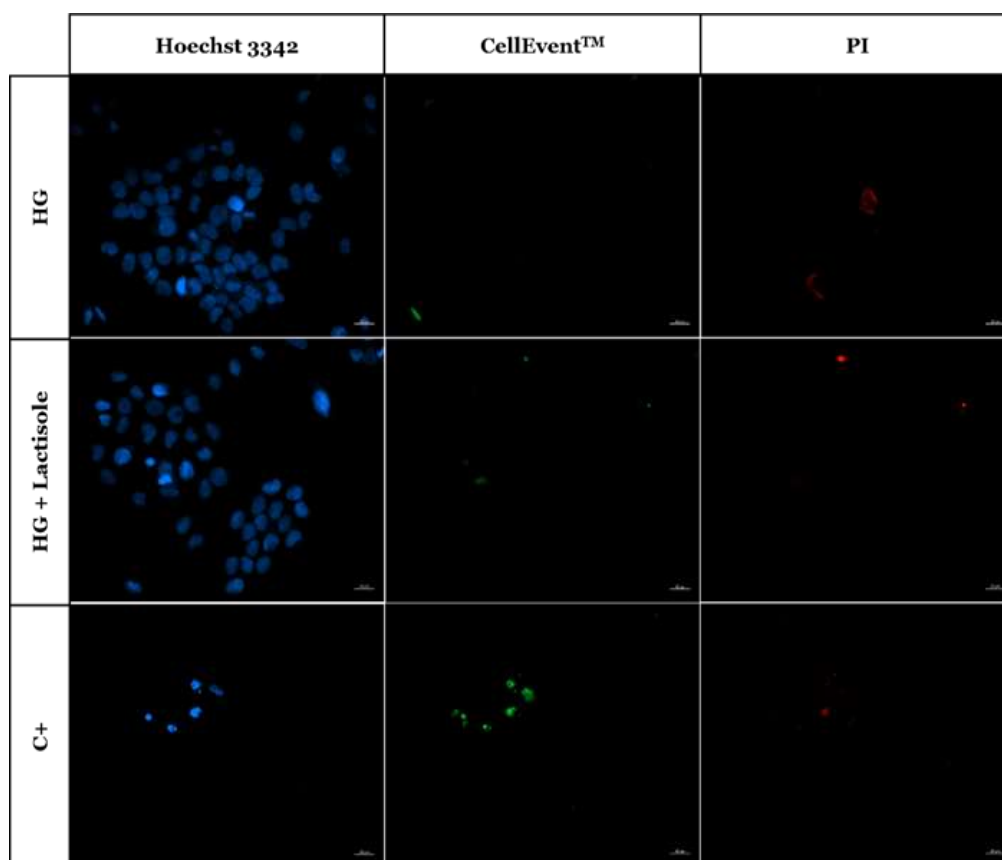
Nas células de cancro colorretal Caco-2 (Figura 13) foi possível observar que o grupo de controlo (HG) migra a um ritmo mais rápido comparativamente às células do grupo cujo recetor do sabor doce foi inibido (HG + Lactisole).

Assim, a inibição do recetor do sabor doce com lactisole mostrou ser eficaz em diminuir a capacidade das células de proliferar e migrar, após 24 e 48 horas (\*\* $p < 0.01$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$ , respetivamente). Após 24 horas, a taxa de migração do grupo controlo

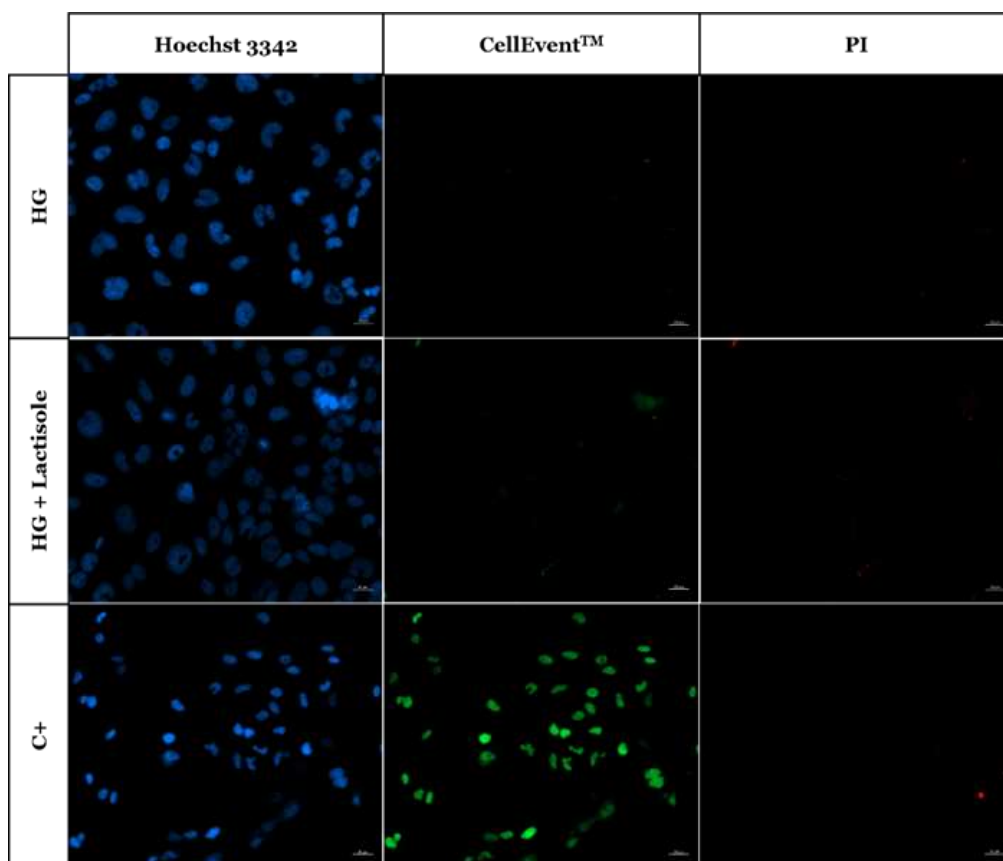
foi de aproximadamente 27%, tendo aumentado para aproximadamente 81% após 48 horas.

#### 4.5 Apoptose celular

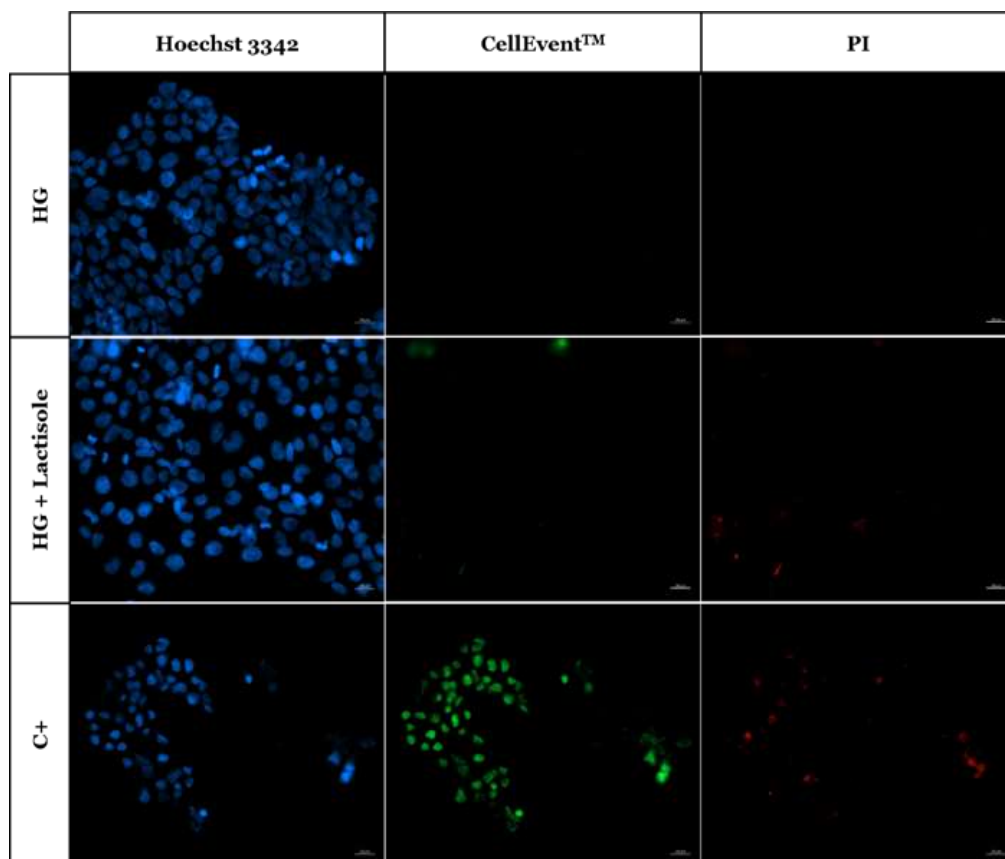
Numa tentativa de esclarecer o mecanismo que leva à diminuição da proliferação e migração das células cancerosas em estudo após bloqueio do recetor do sabor doce com 5 mM de lactisole durante 48 horas, procedeu-se a ensaios de apoptose celular. Para isso utilizou-se um kit comercial *CellEvent™ Caspase-3/7 Green* para marcação das células apoptóticas com caspases-3 e -7 ativadas, e iodeto de propídio para marcação das células mortas com membrana celular comprometida. Adicionalmente, um controlo positivo de apoptose (staurosporine 1  $\mu$ M) foi realizado. As Figuras 14-18 mostram imagens representativas de cada grupo de células.



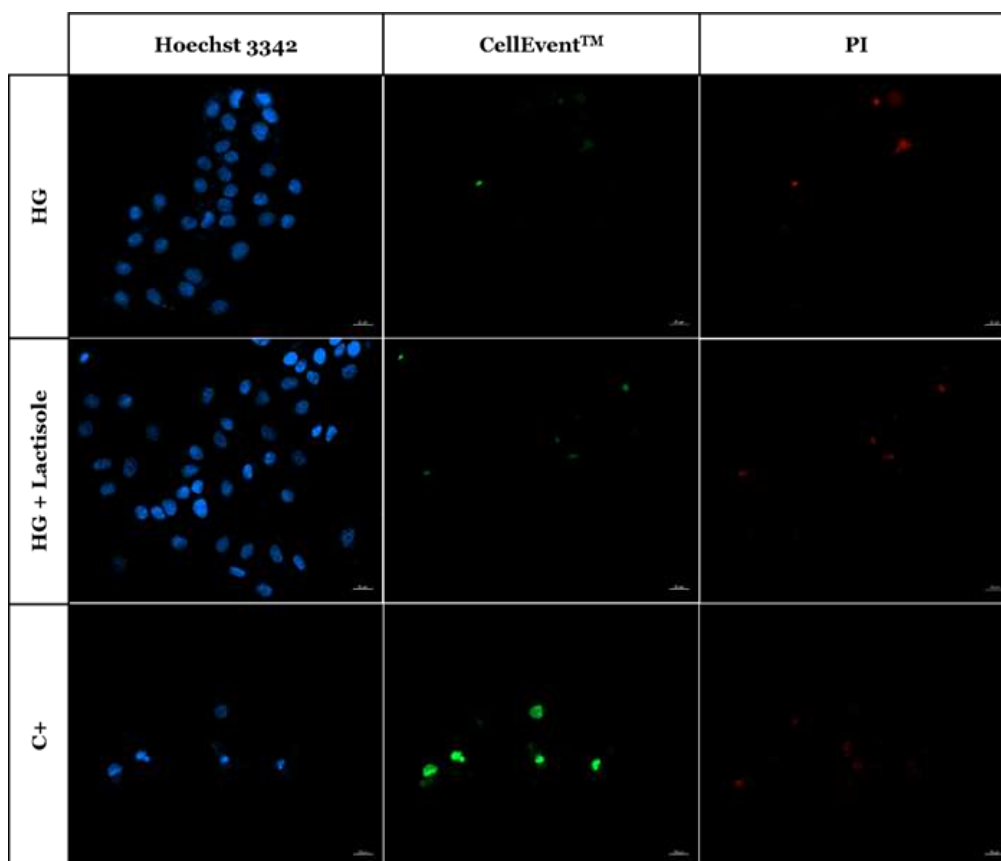
**Figura 14 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular U-87MG.** A apoptose ou morte celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole durante 48 horas, foi observada por microscopia de fluorescência. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoechst 3342, as células apoptóticas foram marcadas com CellEvent™ (verde), e as células mortas foram marcadas com iodeto de propídio (PI; vermelho). Foi utilizado um controlo positivo para apoptose (C+) por incubação das células com staurosporine 1  $\mu$ M durante 48 horas. HG: *High glucose*. Barra de escala: 20  $\mu$ m.



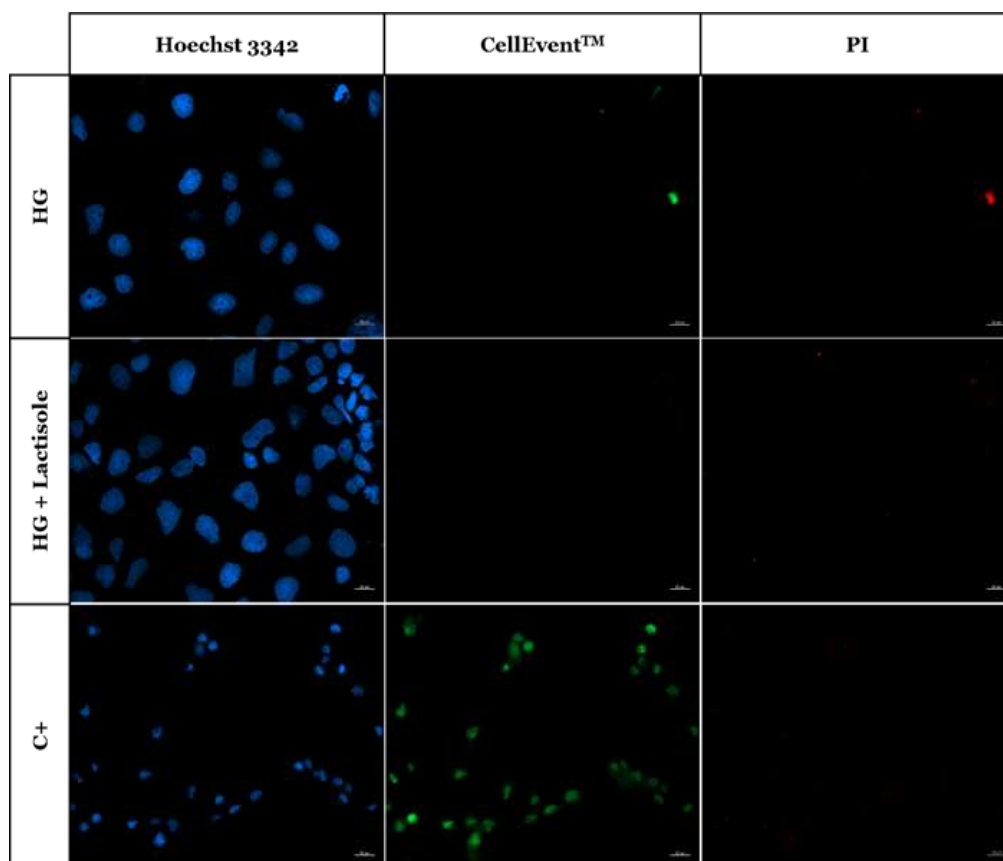
**Figura 15 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular SNB-19.** A apoptose ou morte celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole durante 48 horas, foi observada por microscopia de fluorescência. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoechst 3342, as células apoptóticas foram marcadas com CellEvent™ (verde), e as células mortas foram marcadas com iodeto de propídio (PI; vermelho). Foi utilizado um controlo positivo para apoptose (C+) por incubação das células com staurosporine 1  $\mu$ M durante 48 horas. HG: *High glucose*. Barra de escala: 20  $\mu$ m.



**Figura 16 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular U-373MG.** A apoptose ou morte celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole durante 48 horas, foi observada por microscopia de fluorescência. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoechst 3342, as células apoptóticas foram marcadas com CellEvent™ (verde), e as células mortas foram marcadas com iodeto de propídio (PI; vermelho). Foi utilizado um controlo positivo para apoptose (C+) por incubação das células com staurosporine 1  $\mu$ M durante 48 horas. HG: *High glucose*. Barra de escala: 20  $\mu$ m.



**Figura 17 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular MCF7.** A apoptose ou morte celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole durante 48 horas, foi observada por microscopia de fluorescência. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoechst 3342, as células apoptóticas foram marcadas com CellEvent™ (verde), e as células mortas foram marcadas com iodeto de propídio (PI; vermelho). Foi utilizado um controlo positivo para apoptose (C+) por incubação das células com staurosporine 1  $\mu$ M durante 48 horas. HG: *High glucose*. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

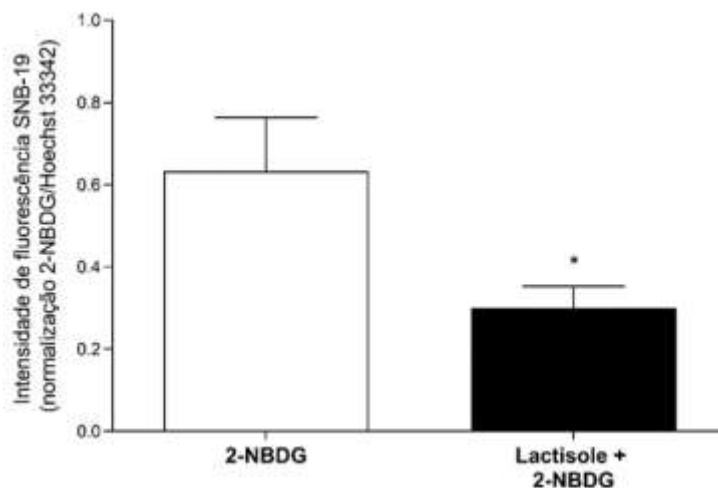


**Figura 18 – O bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce não induz a morte celular ou a apoptose na linha celular Caco-2.** A apoptose ou morte celular após incubação com meio de cultura HG, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole durante 48 horas, foi observada por microscopia de fluorescência. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoechst 3342, as células apoptóticas foram marcadas com CellEvent™ (verde), e as células mortas foram marcadas com iodeto de propídio (PI; vermelho). Foi utilizado um controlo positivo para apoptose (C+) por incubação das células com staurosporine 1  $\mu$ M durante 48 horas. HG: *High glucose*. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

Através das figuras apresentadas (Figuras 14-18) é possível observar que a inibição da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce com lactisole não induz apoptose nas células cancerosas de glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG), de cancro de mama (MCF7) e de cancro colorretal (Caco-2). Adicionalmente, estas células aparentam ter uma morfologia normal, sem visualização de quaisquer indicadores de apoptose, mais especificamente caspases-3 e -7 ativadas. Também não se observou qualquer marcação com iodeto de propídio (vermelho). Assim, pode afirmar-se que a inibição do recetor do sabor doce não induziu apoptose nem morte das células cancerosas em estudo.

## 4.6 Consumo da glucose

De modo a avaliar o efeito do bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce na absorção de glucose pela linha celular de glioblastoma SNB-19, procedeu-se a um ensaio fluorimétrico de *uptake* de glucose usando o marcador 2-NBDG. Como esperado, o bloqueio do T1R3 reduz o consumo da glucose. Os resultados estão representados na figura 19.



**Figura 19 – Efeitos do bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce no consumo da glucose da linha celular de glioblastoma SNB-19.** O *uptake* da glucose foi avaliado nas células de glioblastoma SNB-19 após privação de glucose, na presença ou ausência de 5 mM de lactisole durante 4 horas, e posteriormente medido por espectrofluorimetria após incubação com glucose fluorescente 2-NBDG durante 30 minutos. Para a análise estatística recorreu-se ao *t* test de Student e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$ . Os gráficos de barra apresentados representam as médias  $\pm$  SEM com um  $n=7$ . \* $p < 0.05$ .

O 2-NBDG é um análogo fluorescente da desoxiglucose, que funciona como uma sonda para a deteção da glucose absorvida pelas células. Através da figura 19 é possível observar uma diminuição na quantidade de glucose absorvida pelas células de glioblastoma SNB-19 cujo recetor do sabor doce se encontrava inibido pela presença de lactisole (\* $p < 0.05$ ).



## Capítulo 5

### Discussão

O glioblastoma é caracterizado por ter uma alta atividade proliferativa e elevada vascularização (Schröder et al. 1991; G. Linkous e M. Yazlovitskaya 2011). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de investigação demonstraram a expressão das subunidades T1R2 e T1R3 do recetor do sabor doce neste tipo de tumores. Para além disso, também foi demonstrado que a inibição da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce teve impacto na proliferação das células cancerosas. Tal poderá ser explicado pelo facto de a proliferação destas células ser dependente de elevadas concentrações de glucose, mais especificamente, do processo metabólico da glicólise aeróbica, também conhecido como efeito Warburg (Liberti e Locasale 2016). Assim, o bloqueio da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce poderá ter um papel importante ao impedir a entrada de glucose e, conseqüentemente, limitar a ativação desta via de sinalização. Em humanos, a inibição da subunidade T1R3 do recetor de sabor doce mostrou ter efeitos antidiabéticos, sem apresentar efeitos colaterais negativos (Teff, Emmanuel, e Margolskee 2010). Em ratos, o *knockout* da subunidade T1R3 do recetor de sabor doce desencadeou deficiências no comportamento, aprendizagem e memória (Martin et al. 2017).

O recetor do sabor doce, em vários órgãos, funciona como sensor da disponibilidade e regulador do metabolismo da glucose. A sinalização induzida pelo recetor de sabor doce controla a taxa de absorção e o metabolismo da glucose em células normais do intestino e do cérebro, visto que apresenta um papel importante na regulação da captação de glucose (Smith et al 2018). A sinalização do recetor de sabor doce no intestino normal aumenta a taxa de absorção intestinal da glucose através da regulação de um transportador de glucose nos enterócitos. Em ratos *wild-type*, uma alimentação rica em sacarose proporciona uma redução da absorção de glucose, visto que induz a rápida regulação negativa do recetor de sabor doce no intestino (Smith et al. 2018). Para além disto, a administração de adoçantes não calóricos numa linha celular de cancro gástrico induziu a secreção de serotonina dependente da ativação do recetor de sabor doce, mais especificamente da subunidade T1R3 (Zopun, Lieder, et al. 2018).

Evidências recentes demonstraram a expressão dos genes que codificam os recetores do sabor Tas1r1, Tas1r2 e Tas1r3, e genes associados à proteína G, em diferentes regiões do prosencéfalo sensíveis a nutrientes, incluindo o hipotálamo, hipocampo, a habénula, o córtex e o plexo coroide (Ren et al. 2009). Adicionalmente, os níveis de expressão dos

genes relacionados com o paladar mostraram ser dependentes do estado nutricional do animal, pois a privação alimentar e a hiperglicemia induziram mudanças significativas nos níveis de expressão de Tas1r1 e Tas1r2 no hipotálamo (Ren et al. 2009). A exposição de células do hipotálamo de ratos a um meio com baixo teor de glucose, mantendo as concentrações normais de L-aminoácidos, resultou em níveis mais elevados de expressão do gene Tas1r2, uma das subunidades que constituem o recetor do sabor doce. O fato de que as mudanças nos níveis de expressão em função do estado nutricional foram restritas ao hipotálamo sugere que os mecanismos de sinalização do sabor no cérebro podem estar envolvidos na regulação central dos processos homeostáticos (Ren et al. 2009). Deste modo, os recetores do sabor acoplados à proteína G podem funcionar como quimiossensores ligados à membrana e, em particular, o recetor do sabor doce é um candidato a sensor de glucose cerebral (Ren et al. 2009). Um estudo recente realizado em astrócitos, um tipo de células da mesma origem que o glioblastoma, e em neurónios de diversas regiões do mesencéfalo sensíveis a nutrientes, incluindo o hipotálamo, hipocampo e córtex, sugerem que o recetor do sabor doce tem um papel no controlo do metabolismo da glucose. Para além disto, foi detetada a expressão do recetor do sabor doce em células gliais especializadas sensíveis a elevadas concentrações de glucose, no terceiro ventrículo cerebral (Ren et al 2009; Welcome et al 2018).

As células cancerosas reprogramam o seu metabolismo de modo a promover o crescimento, sobrevivência, proliferação e manutenção durante longos períodos de tempo. Independentemente da presença ou ausência de O<sub>2</sub> e do funcionamento normal da mitocôndria, as células cancerosas tendem a converter a maior parte da glucose em lactato (glicólise aeróbica), processo denominado efeito Warburg (Liberti e Locasale 2016). De modo a prevenir o efeito Warburg, o inibidor da glicólise 2-deoxiglucose, tem sido estudado em ensaios clínicos para o tratamento de glioblastoma, cancro da próstata e de outros tumores sólidos (Mohanti et al. 1996; Stein et al. 2010; Raez et al. 2013). Uma vez demonstrado que a subunidade T1R3 do recetor do sabor doce poderá ter um papel na ativação do efeito Warburg nas células de glioblastoma, surgiu a hipótese de que o mesmo efeito poderá também ocorrer em células de outros tipos de cancro. Assim, procedeu-se ao estudo em células de cancro de mama e cancro colorretal.

À semelhança do que tinha sido realizado anteriormente pelo nosso grupo de investigação em três linhas celulares de glioblastoma, começou-se por confirmar a expressão das subunidades T1R2 e T1R3 do recetor do sabor doce nas células de cancro de mama (MCF7) e de cancro colorretal (Caco-2). No entanto, contrariamente ao

esperado, apenas se confirmou a expressão da subunidade T1R2 nas células de cancro colorretal Caco-2, não tendo sido possível obter a amplificação do gene T1R3. Apesar disso, a análise de dados de *microarrays* para a linha celular Caco-2, bem como os ensaios de imunocitoquímica realizados, mostraram que o mRNA e a proteína da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce se encontram expressos nesta linha celular de cancro colorretal. Seguidamente, foi avaliado o efeito da inibição, com lactisole, da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce nas células em estudo de glioblastoma, cancro da mama e cancro colorretal na viabilidade, migração e apoptose celulares. Num estudo efetuado em células cancerosas do endométrio observou-se que, quando expostas a baixas concentrações de glucose, a capacidade migratória é reduzida e o crescimento e proliferação celulares são inibidos, indicando que os efeitos antiproliferativos exercidos pela privação de glucose podem ser atribuídos à indução da paragem do ciclo celular (senescência) e apoptose (Han et al. 2015). Assim, a inibição do recetor do sabor doce poderá estar associada a uma menor taxa de sobrevivência e capacidade de migração nas células cancerosas. Um estudo recente evidenciou que uma baixa concentração de glucose induz a senescência em astrócitos (Gao et al. 2022). Neste trabalho, a inibição do recetor do sabor doce não induziu apoptose nem morte celulares em nenhuma das linhas celulares em estudo, o que poderá significar que estas células cancerosas se encontram em senescência, possibilidade que está a ser avaliada nestas linhas celulares.

As células cancerosas adaptam-se ao baixo rendimento energético da glicólise através do aumento do *uptake* de glucose para suportar a alta taxa glicolítica (Liberti e Locasale 2016). A elevada taxa de glicólise pode beneficiar as células cancerosas, proporcionando uma elevada taxa de produção de ATP, e fornece muitos intermediários necessários para uma rápida proliferação celular (Lunt e Vander Heiden 2011). A sobrevivência e proliferação das células cancerosas é dependente de elevadas concentrações de glucose (Liberti e Locasale 2016). A inibição da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce na linha celular de glioblastoma SNB-19 levou a uma diminuição do *uptake* da glucose. Curiosamente, um estudo anterior realizado na linha celular de cancro colorretal Caco-2 demonstrou que a inibição da subunidade T1R3 do recetor do sabor doce com lactisole levou a uma diminuição do *uptake* da glucose, o que sugere que o *uptake* da glucose pelas células Caco-2 seja regulado pelo recetor do sabor doce (Andrade, Silva, e Martel 2018). Deste modo, pode-se sugerir que o *uptake* da glucose pelas células SNB-19 possa ser regulado pelo recetor do sabor doce. Contudo, é necessária uma investigação mais aprofundada para concluir tais sugestões.



## Capítulo 6

### Conclusão e Perspetivas Futuras

A descoberta de que o recetor do sabor doce está expresso nas células de glioblastoma, cancro da mama e cancro colorretal e que a sua inibição induz a diminuição da proliferação, migração e sobrevivência, mas sem aumentar a apoptose ou a morte celular, revelou ser um ponto de partida para uma pesquisa com resultados promissores. Adicionalmente, também se evidenciou que a inibição do recetor do sabor doce vai induzir a diminuição da quantidade de glucose absorvida pelas células. Deste modo, pode-se concluir que estes resultados demonstram que o recetor do sabor doce tem um papel importante no funcionamento normal do metabolismo das células cancerosas e que o mesmo é um importante glucossensor da disponibilidade de glucose. Futuramente, existe a necessidade de uma investigação mais aprofundada de modo a descobrir qual o efeito da inibição dos recetores do sabor doce na sobrevivência destas células cancerosas, mais especificamente se estas entram em senescência. E para além disso, pretende-se consolidar os resultados obtidos neste trabalho, através da realização de estudos em células primárias obtidas de tumores e elucidar se os mecanismos pelos quais o recetor do sabor doce reduz a viabilidade e migração envolvem a regulação da reprogramação metabólica das células cancerosas. Seria também interessante estudar os efeitos da inibição do recetor do sabor doce em condições de privação de oxigénio (hipóxia), de forma a replicar as condições do microambiente tumoral.



## Capítulo 7

### Bibliografia

- Abdel-Wahab, Ali F., Waheed Mahmoud, e Randa M. Al-Harizy. 2019. "Targeting Glucose Metabolism to Suppress Cancer Progression: Prospective of Anti-Glycolytic Cancer Therapy". *Pharmacological Research* 150: 104511. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104511>.
- Andrade, Nelson, Cláudia Silva, e Fátima Martel. 2018. "The Effect of Oxidative Stress upon Intestinal Sugar Transport: An *in Vitro* Study Using Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells". *Toxicology Research* 7 (6): 1236–46. <https://doi.org/10.1039/C8TX00183A>.
- Arvelo, Francisco. 2015. "Biology of Colorectal Cancer". *Ecancermedicallscience* <https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.520>.
- Bachmanov, Alexander A., e Gary K. Beauchamp. 2007. "Taste Receptor Genes". *Annual Review of Nutrition* 27 (1): 389–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.111329>.
- Bano, Gul. 2013. "Glucose Homeostasis, Obesity and Diabetes". *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 27 (5): 715–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2013.02.007>.
- Behrens, Maik, e Wolfgang Meyerhof. 2011. "Gustatory and Extragustatory Functions of Mammalian Taste Receptors". *Physiology & Behavior* 105 (1): 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.02.010>.
- Behrens, Maik, e Wolfgang Meyerhof. 2019. "A Role for Taste Receptors in (Neuro)Endocrinology?" *Journal of Neuroendocrinology* 31 (3): e12691. <https://doi.org/10.1111/jne.12691>.
- Bezencon, C., J. le Coutre, e S. Damak. 2007. "Taste-Signaling Proteins Are Coexpressed in Solitary Intestinal Epithelial Cells". *Chemical Senses* 32 (1): 41–49. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjl034>.
- Campos, Fábio Guilherme C.M. de, Isabella Nicácio De Freitas, Antônio Rocco Imperiale, Víctor Edmond Seid, Rodrigo Oliva Perez, Sérgio Carlos Nahas, e Ivan Ceconello. 2010. "Colorectal Cancer in Familial Adenomatous Polyposis: Are There Clinical Predictive Factors?" *Cirugía Española (English Edition)* 88 (6): 390–97. [https://doi.org/10.1016/S2173-5077\(10\)70045-4](https://doi.org/10.1016/S2173-5077(10)70045-4).
- Carey, Ryan M., e Robert J. Lee. 2019. "Taste Receptors in Upper Airway Innate Immunity". *Nutrients* 11 (9): 2017. <https://doi.org/10.3390/nu11092017>.
- Chandrashekar, Jayaram, Mark A. Hoon, Nicholas J. P. Ryba, e Charles S. Zuker. 2006. "The Receptors and Cells for Mammalian Taste". *Nature* 444 (7117): 288–94. <https://doi.org/10.1038/nature05401>.
- Chang, Julie E, Deepak Khuntia, H Ian Robins, e Minesh P Mehta. 2007.

- "Radiotherapy and Radiosensitizers in the Treatment of Glioblastoma Multiforme". *Clinical Advances in Hematology & Oncology* 5 (11): 894-902, 907-15.
- Chaudhari, Nirupa, e Stephen D. Roper. 2010. "The Cell Biology of Taste". *Journal of Cell Biology* 190 (3): 285–96. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003144>
- Damak, Sami, Minqing Rong, Keiko Yasumatsu, Zaza Kokrashvili, Vijaya Varadarajan, Shiyong Zou, Peihua Jiang, Yuzo Ninomiya, e Robert F. Margolskee. 2003. "Detection of Sweet and Umami Taste in the Absence of Taste Receptor T1r3". *Science* 301 (5634): 850–53. <https://doi.org/10.1126/science.1087155>
- DeBerardinis, Ralph J., e Navdeep S. Chandel. 2016. "Fundamentals of Cancer Metabolism". *Science Advances* 2 (5): e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Dehkordi, Ozra, Jed E. Rose, Mehrnaz Fatemi, Joanne S. Allard, Kannan V. Balan, John K. Young, Sabiha Fatima, Richard M. Millis, e Annapurni Jayam-Trouth. 2012. "Neuronal Expression of Bitter Taste Receptors and Downstream Signaling Molecules in the Rat Brainstem". *Brain Research* 1475: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.038>
- Duffy VB, Anderson GH. 1998. "Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners". *Journal of the American Dietetic Association* 98 (5): 580–7. [https://doi.org/10.1016/s0002-8223\(98\)00131-x](https://doi.org/10.1016/s0002-8223(98)00131-x)
- D'Urso, Ottavio, e Filippo Drago. 2021. "Pharmacological Significance of Extra-Oral Taste Receptors". *European Journal of Pharmacology* 910: 174480. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174480>
- Elliott, Ruth A., Shalini Kapoor, e Douglas G. Tincello. 2011. "Expression and Distribution of the Sweet Taste Receptor Isoforms T1R2 and T1R3 in Human and Rat Bladders". *Journal of Urology* 186 (6): 2455–62. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.07.083>
- Ellor, Susan V., Teri Ann Pagano-Young, e Nicholas G. Avgeropoulos. 2014. "Glioblastoma: Background, Standard Treatment Paradigms, and Supportive Care Considerations". *Journal of Law, Medicine & Ethics* 42 (2): 171–82. <https://doi.org/10.1111/jlme.12133>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed: 03/04/2022
- Fisusi, Funmilola A., e Emmanuel O. Akala. 2019. "Drug Combinations in Breast Cancer Therapy". *Pharmaceutical Nanotechnology* 7 (1): 3–23. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190122111224>
- Foster, Simon R., Enzo R. Porrello, Brooke Purdue, Hsiu-Wen Chan, Anja Voigt, Sabine Frenzel, Ross D. Hannan, et al. 2013. "Expression, Regulation and Putative Nutrient-Sensing Function of Taste GPCRs in the Heart". Editado por Yoshiro Ishimaru. *PLoS ONE* 8 (5): e64579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064579>
- G. Linkous, Amanda, e Eugenia M. Yazlovitskaya. 2011. "Angiogenesis in Glioblastoma

- Multiforme: Navigating the Maze". *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 11 (8): 712–18. <https://doi.org/10.2174/187152011797378643>
- Gezginci-Oktayoglu, Selda, Merve Ercin, Serap Sancar, Ertan Celik, Meral Koyuturk, Sema Bolkent, e Sehnaz Bolkent. 2021. "Aspartame Induces Cancer Stem Cell Enrichment through P21, NICD and GLI1 in Human PANC-1 Pancreas Adenocarcinoma Cells". *Food and Chemical Toxicology* 153: 112264. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112264>
- Gilca, Marilena, e Dorin Dragos. 2017. "Extraoral Taste Receptor Discovery: New Light on Ayurvedic Pharmacology". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017: 1–30. <https://doi.org/10.1155/2017/5435831>
- Gong, Ting, Quanwei Wei, Dagan Mao, e Fangxiong Shi. 2016. "Expression Patterns of Taste Receptor Type 1 Subunit 3 and  $\alpha$ -Gustducin in the Mouse Testis during Development". *Acta Histochemica* 118 (1): 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.11.001>
- Grobben, Bert, Peter De Deyn, e Herman Slegers. 2002. "Rat C6 Glioma as Experimental Model System for the Study of Glioblastoma Growth and Invasion". *Cell and Tissue Research* 310 (3): 257–70. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0651-7>
- Hanahan, Douglas. 2022. "Hallmarks of Cancer: New Dimensions". *Cancer Discovery* 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, Douglas, e Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation". *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hassen, Samar. 2012. "Molecular Signaling Mechanisms of Apoptosis in Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer". *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 3 (3): 71. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v3.i3.71>
- Hatten, Kyle M., James N. Palmer, Robert J. Lee, Nithin D. Adappa, David W. Kennedy, e Noam A. Cohen. 2015. "Corticosteroid Use Does Not Alter Nasal Mucus Glucose in Chronic Rhinosinusitis". *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 152 (6): 1140–44. <https://doi.org/10.1177/0194599815577567>
- Henquin, J.C. 2012. "Do pancreatic beta cells "taste" nutrients to secrete insulin?" *Science Signaling*. 5 (239): 36. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003325>
- Herrera Moro Chao, D., C. Argmann, M. Van Eijk, R. G. Boot, R. Ottenhoff, C. Van Roomen, E. Foppen, et al. 2016. "Impact of Obesity on Taste Receptor Expression in Extra-Oral Tissues: Emphasis on Hypothalamus and Brainstem". *Scientific Reports* 6 (1): 29094. <https://doi.org/10.1038/srep29094>
- Holland, E. C. 2000. "Glioblastoma Multiforme: The Terminator". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (12): 6242–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6242>
- Hoon, Mark A, Elliot Adler, James F Battey, Nicholas J P Ryba, e Charles S Zuker. 1999. "Putative Mammalian Taste Receptors: A Class of Taste-Specific GPCRs with Distinct Topographic Selectivity". *Cell* 96 (4): 541–551. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80658-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80658-3)

- Howard, Barbara V., e Judith Wylie-Rosett. 2002. "Sugar and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the Committee on Nutrition of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism of the American Heart Association". *Circulation* 106 (4): 523–27.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000019552.77778.04>
- Jang, H.-J., Z. Kokrashvili, M. J. Theodorakis, O. D. Carlson, B.-J. Kim, J. Zhou, H. H. Kim, et al. 2007. "Gut-Expressed Gustducin and Taste Receptors Regulate Secretion of Glucagon-like Peptide-1". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (38): 15069–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706890104>
- Jiang, Peihua, Meng Cui, Baohua Zhao, Zhan Liu, Lenore A. Snyder, Lumie M.J. Benard, Roman Osman, Robert F. Margolskee, e Marianna Max. 2005. "Lactisole Interacts with the Transmembrane Domains of Human T1R3 to Inhibit Sweet Taste". *Journal of Biological Chemistry* 280 (15): 15238–46.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M414287200>
- Jiang, Peihua, Meng Cui, Baohua Zhao, Lenore A. Snyder, Lumie M.J. Benard, Roman Osman, Marianna Max, e Robert F. Margolskee. 2005. "Identification of the Cyclamate Interaction Site within the Transmembrane Domain of the Human Sweet Taste Receptor Subunit T1R3". *Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 34296–305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505255200>
- Karcher, Sibylle, Hans-Herbert Steiner, Rezvan Ahmadi, Saida Zoubaa, Gergely Vasvari, Harry Bauer, Andreas Unterberg, e Christel Herold-Mende. 2006. "Different Angiogenic Phenotypes in Primary and Secondary Glioblastomas". *International Journal of Cancer* 118 (9): 2182–89.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.21648>
- Kinnamon, Sue C., e Thomas E. Finger. 2019. "Recent Advances in Taste Transduction and Signaling". *F1000Research* 8: 2117.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.21099.1>
- Kochem, Matthew. 2017. "Type 1 Taste Receptors in Taste and Metabolism". *Annals of Nutrition and Metabolism* 70 (Suppl. 3): 27–36.  
<https://doi.org/10.1159/000478760>
- Kokabu, Shoichiro, Jonathan Lowery, Takashi Toyono, Tsuyoshi Sato, e Tetsuya Yoda. 2017. "On the Emerging Role of the Taste Receptor Type 1 (T1R) Family of Nutrient-Sensors in the Musculoskeletal System". *Molecules* 22 (3): 469.  
<https://doi.org/10.3390/molecules22030469>
- Kuipers, Ernst J., William M. Grady, David Lieberman, Thomas Seufferlein, Joseph J. Sung, Petra G. Boelens, Cornelis J. H. van de Velde, e Toshiaki Watanabe. 2015. "Colorectal Cancer". *Nature Reviews Disease Primers* 1 (1): 15065.  
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Laffitte, Anni, Fabrice Neiers, e Loïc Briand. 2014. "Functional Roles of the Sweet Taste Receptor in Oral and Extraoral Tissues": *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 17 (4): 379–85.  
<https://doi.org/10.1097/MCO.000000000000058>
- Lambert, Arthur W., Diwakar R. Pattabiraman, e Robert A. Weinberg. 2017. "Emerging Biological Principles of Metastasis". *Cell* 168 (4): 670–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>

- Lee, Allen, e Chung Owyang. 2017. "Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses". *Nutrients* 9 (7): 653. <https://doi.org/10.3390/nu9070653>
- Lee, Robert J., e Noam A. Cohen. 2014. "Bitter and Sweet Taste Receptors in the Respiratory Epithelium in Health and Disease". *Journal of Molecular Medicine* 92 (12): 1235–44. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1222-6>
- Lee, Robert J., Jennifer M. Kofonow, Philip L. Rosen, Adam P. Siebert, Bei Chen, Laurel Doghramji, Guoxiang Xiong, et al. 2014. "Bitter and Sweet Taste Receptors Regulate Human Upper Respiratory Innate Immunity". *Journal of Clinical Investigation* 124 (3): 1393–1405. <https://doi.org/10.1172/JCI72094>
- Li, F. 2013. "Taste Perception: From the Tongue to the Testis". *Molecular Human Reproduction* 19 (6): 349–60. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat009>
- Li, X., L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller, e E. Adler. 2002. "Human Receptors for Sweet and Umami Taste". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (7): 4692–96. <https://doi.org/10.1073/pnas.072090199>
- Liberti, Maria V., e Jason W. Locasale. 2016. "The Warburg Effect: How Does It Benefit Cancer Cells?" *Trends in Biochemical Sciences* 41 (3): 211–18. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Lin, Otto S. 2012. "Colorectal Cancer Screening in Patients at Moderately Increased Risk Due to Family History". *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 4 (6): 125. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v4.i6.125>
- Lindemann, Bernd. 2001. "Receptors and Transduction in Taste". *Nature* 413 (6852): 219–25. <https://doi.org/10.1038/35093032>
- Liu, Chang, Ying Jin, e Zhimin Fan. 2021. "The Mechanism of Warburg Effect-Induced Chemoresistance in Cancer". *Frontiers in Oncology* 11: 698023. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.698023>
- Lunt, Sophia Y., e Matthew G. Vander Heiden. 2011. "Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation". *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27 (1): 441–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-1542377>
- Maina, Ivy W., Alan D. Workman, e Noam A. Cohen. 2018. "The Role of Bitter and Sweet Taste Receptors in Upper Airway Innate Immunity: Recent Advances and Future Directions". *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery* 4 (3): 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.wjorl.2018.07.003>
- Martin, Bronwen, Rui Wang, Wei-Na Cong, Caitlin M. Daimon, Wells W. Wu, Bin Ni, Kevin G. Becker, et al. 2017. "Altered Learning, Memory, and Social Behavior in Type 1 Taste Receptor Subunit 3 Knock-out Mice Are Associated with Neuronal Dysfunction". *Journal of Biological Chemistry* 292 (27): 11508–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773820>
- Marusyk, Andriy, Vanessa Almendro, e Kornelia Polyak. 2012. "Intra-Tumour Heterogeneity: A Looking Glass for Cancer?" *Nature Reviews Cancer* 12 (5): 323–34. <https://doi.org/10.1038/nrc3261>
- Masubuchi, Yosuke, Yuko Nakagawa, Jinhui Ma, Tsutomu Sasaki, Tadahiro Kitamura,

- Yoritsuna Yamamoto, Hitoshi Kurose, Itaru Kojima, e Hiroshi Shibata. 2013. "A Novel Regulatory Function of Sweet Taste-Sensing Receptor in Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Cells". Editado por Xing-Ming Shi. PLoS ONE 8 (1): e54500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054500>
- METABRIC Group, Christina Curtis, Sohrab P. Shah, Suet-Feung Chin, Gulisa Turashvili, Oscar M. Rueda, Mark J. Dunning, et al. 2012. "The Genomic and Transcriptomic Architecture of 2,000 Breast Tumours Reveals Novel Subgroups". *Nature* 486 (7403): 346–52. <https://doi.org/10.1038/nature10983>
- Meyer, Dorke, Anja Voigt, Patricia Widmayer, Heike Borth, Sandra Huebner, Andreas Breit, Susan Marschall, et al. 2012. "Expression of Tas1 Taste Receptors in Mammalian Spermatozoa: Functional Role of Tas1r1 in Regulating Basal Ca<sup>2+</sup> and CAMP Concentrations in Spermatozoa". Editado por Hiroaki Matsunami. PLoS ONE 7 (2): e32354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032354>
- Mohanti, Bidhu K., Goura K. Rath, Naranappa Anantha, V. Kannan, Bhabani S. Das, Bangalore A.R. Chandramouli, Ajit K. Banerjee, et al. 1996. "Improving Cancer Radiotherapy with 2-Deoxy-d-Glucose: Phase I/II Clinical Trials on Human Cerebral Gliomas". *International Journal of Radiation Oncology\*Biological\*Physics* 35 (1): 103–11. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(96\)85017-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(96)85017-6)
- Molitor, Elena von, Katja Riedel, Michael Krohn, Mathias Hafner, Rüdiger Rudolf, e Tiziana Cesetti. 2021. "Sweet Taste Is Complex: Signaling Cascades and Circuits Involved in Sweet Sensation". *Frontiers in Human Neuroscience* 15: 667709. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.667709>
- Mosinger, B., K. M. Redding, M. R. Parker, V. Yevshayeva, K. K. Yee, K. Dyomina, Y. Li, e R. F. Margolskee. 2013. "Genetic Loss or Pharmacological Blockade of Testes-Expressed Taste Genes Causes Male Sterility". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (30): 12319–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302827110>
- Murtaza, Babar, Aziz Hichami, Amira S. Khan, François Ghiringhelli, e Naim A. Khan. 2017. "Alteration in Taste Perception in Cancer: Causes and Strategies of Treatment". *Frontiers in Physiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00134>
- Nakagita, Tomoya, Akiko Ishida, Takumi Matsuya, Takuya Kobayashi, Masataka Narukawa, Takatsugu Hirokawa, Makoto Hashimoto, e Takumi Misaka. 2019. "Structural Insights into the Differences among Lactisole Derivatives in Inhibitory Mechanisms against the Human Sweet Taste Receptor". Editado por Maik Behrens. PLoS ONE 14 (3): e0213552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213552>
- Nakagita, Tomoya, Chiaki Taketani, Masataka Narukawa, Takatsugu Hirokawa, Takuya Kobayashi, e Takumi Misaka. 2020. "Ibuprofen, a Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug, Is a Potent Inhibitor of the Human Sweet Taste Receptor". *Chemical Senses* 45 (8): 667–73. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjaa057>
- National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Understanding Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>, accessed: 23/02/2022

- Navale, Archana M., e Archana N. Paranjape. 2016. "Glucose Transporters: Physiological and Pathological Roles". *Biophysical Reviews* 8 (1): 5–9. <https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2>
- Nelson, Greg, Mark A. Hoon, Jayaram Chandrashekar, Yifeng Zhang, Nicholas J.P. Ryba, e Charles S. Zuker. 2001. "Mammalian Sweet Taste Receptors". *Cell* 106 (3): 381–90. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00451-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00451-2)
- Ostrom, Q. T., L. Bauchet, F. G. Davis, I. Deltour, J. L. Fisher, C. E. Langer, M. Pekmezci, et al. 2014. "The Epidemiology of Glioma in Adults: A "State of the Science" Review". *Neuro-Oncology* 16 (7): 896–913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
- Ostrom, Quinn T., Haley Gittleman, Jordonna Fulop, Max Liu, Rachel Blanda, Courtney Kromer, Yingli Wolinsky, Carol Kruchko, e Jill S. Barnholtz-Sloan. 2015. "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012". *Neuro-Oncology* 17 (suppl 4): iv1–62. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189>
- Park, Jae-Hyung, e Dae-Kyu Song. 2019. "Correction to: Sweet Taste Receptors as a Tool for an Amplifying Pathway of Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Pancreatic  $\beta$  Cells". *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 471 (7): 1041–1041. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02284-1>
- Perou, Charles M., Therese Sørlie, Michael B. Eisen, Matt van de Rijn, Stefanie S. Jeffrey, Christian A. Rees, Jonathan R. Pollack, et al. 2000. "Molecular Portraits of Human Breast Tumours". *Nature* 406 (6797): 747–52. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Philippaert, Koenraad, Andy Pironet, Margot Mesuere, William Sones, Laura Vermeiren, Sara Kerselaers, Sílvia Pinto, et al. 2017. "Steviol Glycosides Enhance Pancreatic Beta-Cell Function and Taste Sensation by Potentiation of TRPM5 Channel Activity". *Nature Communications* 8 (1): 14733. <https://doi.org/10.1038/ncomms14733>
- Phillips, Heidi S., Samir Kharbanda, Ruihuan Chen, William F. Forrest, Robert H. Soriano, Thomas D. Wu, Anjan Misra, et al. 2006. "Molecular Subclasses of High-Grade Glioma Predict Prognosis, Delineate a Pattern of Disease Progression, and Resemble Stages in Neurogenesis". *Cancer Cell* 9 (3): 157–73. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.019>
- Raez, Luis E., Kyriakos Papadopoulos, Alejandro D. Ricart, E. Gabriella Chiorean, Robert S. DiPaola, Mark N. Stein, Caio M. Rocha Lima, et al. 2013. "A Phase I Dose-Escalation Trial of 2-Deoxy-d-Glucose Alone or Combined with Docetaxel in Patients with Advanced Solid Tumors". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71 (2): 523–30. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2045-1>
- Rajkumar, Premraj, William H. Aisenberg, Omar W. Acres, Ryan J. Protzko, e Jennifer L. Pluznick. 2014. "Identification and Characterization of Novel Renal Sensory Receptors". Editado por Johannes Reisert. *PLoS ONE* 9 (10): e111053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111053>
- Raybould, Helen E. 1998. "Does Your Gut Taste? Sensory Transduction in the Gastrointestinal Tract". *Physiology* 13 (6): 275–80.

<https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1998.13.6.275>

- Reed, Danielle R, e Amanda H McDaniel. 2006. "The Human Sweet Tooth". *BMC Oral Health* 6 (S1): S17. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S17>
- Reeder, J. G., & Vogel, V. G. 2008. "Breast cancer prevention". *Cancer treatment and research*, 141: 149–164. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-73161-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-0-387-73161-2_10)
- Ren, Xueying. 2009. "Sweet Taste Signaling Functions as a Hypothalamic Glucose Sensor". *Frontiers in Integrative Neuroscience* 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.07.012.2009>
- Rossi, Lorenzo, Calogero Mazzara, e Olivia Pagani. 2019. "Diagnosis and Treatment of Breast Cancer in Young Women". *Current Treatment Options in Oncology* 20 (12): 86. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0685-7>
- Santos, C.R.A., A.C. Duarte, A.R. Costa, J. Tomás, T. Quintela, e I. Gonçalves. 2019. "The Senses of the Choroid Plexus". *Progress in Neurobiology* 182: 101680. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101680>
- Sarkar, Sibaji, Garrick Horn, Kimberly Moulton, Anuja Oza, Shannon Byler, Shannon Kokolus, e McKenna Longacre. 2013. "Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview". *International Journal of Molecular Sciences* 14 (10): 21087–113. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>
- Schiffman, S. S. 1999. "Selective Inhibition of Sweetness by the Sodium Salt of +/-2-(4-Methoxyphenoxy) Propanoic Acid". *Chemical Senses* 24 (4): 439–47. <https://doi.org/10.1093/chemse/24.4.439>
- Schröder, R., K. Bien, R. Kott, I. Meyers, e R. Vössing. 1991. "The Relationship between Ki-67 Labeling and Mitotic Index in Gliomas and Meningiomas: Demonstration of the Variability of the Intermitotic Cycle Time". *Acta Neuropathologica* 82 (5): 389–94. <https://doi.org/10.1007/BF00296550>
- Sclafani, Anthony, e Catalina Pérez. 1997. "Cypha<sup>TM</sup> [Propionic Acid, 2-(4-Methoxyphenol) Salt] Inhibits Sweet Taste in Humans, but Not in Rats". *Physiology & Behavior* 61 (1): 25–29. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00316-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00316-2)
- Seyfried, Thomas N, e Laura M Shelton. 2010. "Cancer as a Metabolic Disease". *Nutrition & Metabolism*. (7): 7. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-7>
- Shil, Aparna, Oluwatobi Olusanya, Zaynub Ghufloor, Benjamin Forson, Joanne Marks, e Havovi Chichger. 2020. "Artificial Sweeteners Disrupt Tight Junctions and Barrier Function in the Intestinal Epithelium through Activation of the Sweet Taste Receptor, T1R3". *Nutrients* 12 (6): 1862. <https://doi.org/10.3390/nu12061862>
- Shin, Yoo-Jin, Joo-Hee Park, Jeong-Sun Choi, Myung-Hoon Chun, Young Wha Moon, e Mun-Yong Lee. 2010. "Enhanced Expression of the Sweet Taste Receptors and Alpha-Gustducin in Reactive Astrocytes of the Rat Hippocampus Following Ischemic Injury". *Neurochemical Research* 35 (10): 1628–34. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0223-2>

- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, e Ahmedin Jemal. 2019. "Cancer Statistics, 2019". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69 (1): 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Sigoillot, Maud, Anne Brockhoff, Wolfgang Meyerhof, e Loïc Briand. 2012. "Sweet-Taste-Suppressing Compounds: Current Knowledge and Perspectives of Application". *Applied Microbiology and Biotechnology* 96 (3): 619–30. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4387-3>
- Smith, Kathleen, Elnaz Karimian Azari, Traci E. LaMoia, Tania Hussain, Veronika Vargova, Katalin Karolyi, Paula P. Veldhuis, et al. 2018. "T1R2 Receptor-Mediated Glucose Sensing in the Upper Intestine Potentiates Glucose Absorption through Activation of Local Regulatory Pathways". *Molecular Metabolism* 17: 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.08.009>
- Stein, Mark, Hongxia Lin, Chandrika Jeyamohan, Dmitri Dvorzhinski, Murugesan Gounder, Kevin Bray, Simantini Eddy, Susan Goodin, Eileen White, e Robert S. DiPaola. 2010. "Targeting Tumor Metabolism with 2-Deoxyglucose in Patients with Castrate-Resistant Prostate Cancer and Advanced Malignancies". *The Prostate* 70 (13): 1388–94. <https://doi.org/10.1002/pros.21172>
- Stevanovic A, Lee P, Wilcken N. 2006. "Metastatic breast cancer". *Australian Family Physician* 35 (5): 309–11.
- Stupp, Roger, Michael Weller, Karl Belanger, Ulrich Bogdahn, Samuel K Ludwin, Denis Lacombe, e René O Mirimanoff. 2005. "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma". *The New England Journal of Medicine*. 352 (10): 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Sun, Yi-Sheng, Zhao Zhao, Zhang-Nv Yang, Fang Xu, Hang-Jing Lu, Zhi-Yong Zhu, Wen Shi, Jianmin Jiang, Ping-Ping Yao, e Han-Ping Zhu. 2017. "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer". *International Journal of Biological Sciences* 13 (11): 1387–97. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Taniguchi, Kazumi. 2004. "Expression of the Sweet Receptor Protein, T1R3, in the Human Liver and Pancreas". *Journal of Veterinary Medical Science* 66 (11): 1311–14. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1311>
- Teff, K.L., G. Emmanuel, e R. Margolskee. 2010. "Inhibition of the sweet taste receptor with lactisole attenuates post-prandial glucose levels and increases glucagon-like peptide levels in normal weight men". *Appetite* 54 (3):678. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2010.04.195>
- Thakkar, Jigisha P., Therese A. Dolecek, Craig Horbinski, Quinn T. Ostrom, Donita D. Lightner, Jill S. Barnholtz-Sloan, e John L. Villano. 2014. "Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma". *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 23 (10): 1985–96. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>
- The Cancer Genome Atlas Network. 2012. "Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours". *Nature* 490 (7418): 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- The Protein Data Bank. Nuemket, N., Yasui, N., Atsumi, N., Yamashita, A. 2017. *Nat. Commun.* 8: 15530-15530. PDB ID: 5X2N, 5X2Q, 5X2P, 5X2O, 5X2M.

<https://doi.org/10.2210/pdb5X2N/pdb>

- Tomás, J., C.R.A. Santos, T. Quintela, e I. Gonçalves. 2016. "“Tasting” the Cerebrospinal Fluid: Another Function of the Choroid Plexus?" *Neuroscience* 320: 160–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.057>
- Toyono, Takashi, Yuji Seta, Shinji Kataoka, e Kuniaki Toyoshima. 2007. "CCAAT/Enhancer-Binding Protein  $\beta$  Regulates Expression of Human T1R3 Taste Receptor Gene in the Bile Duct Carcinoma Cell Line, HuCCT1". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1769 (11–12): 641–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.08.003>
- Tsutsumi, Rie, Masakazu Goda, Chisa Fujimoto, Kyoko Kanno, Misaki Nobe, Yoshiaki Kitamura, Koji Abe, et al. 2016. "Effects of Chemotherapy on Gene Expression of Lingual Taste Receptors in Patients with Head and Neck Cancer: Effect of Chemotherapy on Taste Receptor mRNA". *The Laryngoscope* 126 (3): E103–9. <https://doi.org/10.1002/lary.25679>
- Urbańska, Kaja, Justyna Sokołowska, Maciej Szmidt, e Paweł Sysa. 2014. "Review Glioblastoma Multiforme – an Overview". *Współczesna Onkologia* 5: 307–12. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
- Van Cutsem, E., A. Cervantes, B. Nordlinger, e D. Arnold. 2014. "Metastatic Colorectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up". *Annals of Oncology* 25: iii1–9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu260>
- Van Cutsem, E., B. Nordlinger, e A. Cervantes. 2010. "Advanced Colorectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Treatment". *Annals of Oncology* 21: v93–97. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq222>
- Vander Heiden, Matthew G., Lewis C. Cantley, e Craig B. Thompson. 2009. "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation". *Science* 324 (5930): 1029–33. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vogelstein, Bert, e Kenneth W Kinzler. 2004. "Cancer Genes and the Pathways They Control". *Nature Medicine* 10 (8): 789–99. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Wang, Da, Chao Wang, Liang Wang, e Yue Chen. 2019. "A Comprehensive Review in Improving Delivery of Small-Molecule Chemotherapeutic Agents Overcoming the Blood-Brain/Brain Tumor Barriers for Glioblastoma Treatment". *Drug Delivery* 26 (1): 551–65. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1616235>
- Watson, Alastair J.M., e Paul D. Collins. 2011. "Colon Cancer: A Civilization Disorder". *Digestive Diseases* 29 (2): 222–28. <https://doi.org/10.1159/000323926>
- Wauson, Eric M., Elma Zaganjor, A-Young Lee, Marcy L. Guerra, Anwasha B. Ghosh, Angie L. Bookout, Chris P. Chambers, et al. 2012. "The G Protein-Coupled Taste Receptor T1R1/T1R3 Regulates MTORC1 and Autophagy". *Molecular Cell* 47 (6): 851–62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.001>
- Welcome, Menizibeya O., e Nikos E. Mastorakis. 2018. "Emerging Concepts in Brain

- Glucose Metabolic Functions: From Glucose Sensing to How the Sweet Taste of Glucose Regulates Its Own Metabolism in Astrocytes and Neurons". *NeuroMolecular Medicine* 20 (3): 281–300.  
<https://doi.org/10.1007/s12017-018-8503-0>
- Wilson, Taylor A, Matthias A Karajannis, e David H Harter. 2014. "Glioblastoma Multiforme: State of the Art and Future Therapeutics". *Surgical Neurology International* 5 (1): 64. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.132138>
- Xie, Yuan-Hong, Ying-Xuan Chen, e Jing-Yuan Fang. 2020. "Comprehensive Review of Targeted Therapy for Colorectal Cancer". *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Xu, H., L. Staszewski, H. Tang, E. Adler, M. Zoller, e X. Li. 2004. "Different Functional Roles of T1R Subunits in the Heteromeric Taste Receptors". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (39): 14258–63.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0404384101>
- Yamamoto, Kurumi, e Yoshiro Ishimaru. 2013. "Oral and Extra-Oral Taste Perception". *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24 (3): 240–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.08.005>
- Yeo, Syn Kok, e Jun-Lin Guan. 2017. "Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor?" *Trends in Cancer* 3 (11): 753–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.09.001>
- Young, Richard L., Bridgette Chia, Nicole J. Isaacs, Jing Ma, Joan Khoo, Tongzhi Wu, Michael Horowitz, e Christopher K. Rayner. 2013. "Disordered Control of Intestinal Sweet Taste Receptor Expression and Glucose Absorption in Type 2 Diabetes". *Diabetes* 62 (10): 3532–41. <https://doi.org/10.2337/db13-0581>
- Zehr, K. R. 2019. "Diagnosis and treatment of breast cancer in Men". *Radiologic Technology*, 91 (1): 51M-61M.
- Zhai, Kui, Zhiguang Yang, Xiaofei Zhu, Eric Nyirimigabo, Yue Mi, Yan Wang, Qinghua Liu, et al. 2016. "Activation of Bitter Taste Receptors (Tas2rs) Relaxes Detrusor Smooth Muscle and Suppresses Overactive Bladder Symptoms". *Oncotarget* 7 (16): 21156–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8549>
- Zhao, Grace Q., Yifeng Zhang, Mark A. Hoon, Jayaram Chandrashekar, Isolde Erlenbach, Nicholas J.P. Ryba, e Charles S. Zuker. 2003. "The Receptors for Mammalian Sweet and Umami Taste". *Cell* 115 (3): 255–66.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00844-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00844-4)
- Zopun, Muhammet, Barbara Lieder, Ann-Katrin Holik, Jakob P. Ley, Joachim Hans, e Veronika Somoza. 2018. "Noncaloric Sweeteners Induce Peripheral Serotonin Secretion via the T1R3-Dependent Pathway in Human Gastric Parietal Tumor Cells (HGT-1)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (27): 7044–53.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02071>
- Zopun, Muhammet, Kathrin I. Liszt, Verena Stoeger, Maik Behrens, Ulrike Redel, Jakob P. Ley, Joachim Hans, e Veronika Somoza. 2018. "Human Sweet Receptor T1R3 Is Functional in Human Gastric Parietal Tumor Cells (HGT-1) and Modulates Cyclamate and Acesulfame K-Induced Mechanisms of Gastric

Acid Secretion". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (19): 4842–52.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00658>