



**FRANCO APARECIDO ROSSATO**

**“EFEITOS DOS INIBIDORES DA ENZIMA ÁCIDO  
GRAXO SINTASE SOBRE APOPTOSE E FUNÇÃO  
MITOCONDRIAL DE CÉLULAS NÃO  
TUMORIGÊNICAS”**

**“FATTY ACID SYNTHASE INHIBITORS EFFECTS ON  
APOPTOSIS AND MITOCHONDRIAL FUNCTION IN  
NON TUMORIGENIC CELLS”**

**CAMPINAS**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**FRANCO APARECIDO ROSSATO**

**“EFEITOS DOS INIBIDORES DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO  
SINTASE SOBRE APOPTOSE E FUNÇÃO MITOCONDRIAL DE  
CÉLULAS NÃO TUMORIGÊNICAS”**

**Orientador/Supervisor: Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi**

**Coorientadora/Co-supervisora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karina Gottardello Zecchin**

**“FATTY ACID SYNTHASE INHIBITORS EFFECTS ON  
APOPTOSIS AND MITOCHONDRIAL FUNCTION IN NON  
TUMORIGENIC CELLS”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Doctorate Thesis presented to the Medical Pathophysiology Postgraduation Programme of the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Science.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELO ALUNO FRANCO APARECIDO ROSSATO  
E ORIENTADO PELO PROF.DR. ANIBAL EUGENIO VERCESI**  
Assinatura do Orientador

---

**CAMPINAS**

**2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R733e Rossato, Franco Aparecido, 1984-  
Efeitos dos inibidores da enzima ácido graxo sintase sobre apoptose e função mitocondrial de células não tumorigênicas / Franco Aparecido Rossato. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Anibal Eugenio Vercesi.  
Coorientador : Karina Gottardelo Zecchin.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Melanócitos. 2. Inibidores da síntese de ácidos graxos. 3. Apoptose. 4. Mitocôndria. 5. Complexo ácido graxo sintetase. 6. Proteoma. I. Vercesi, Anibal Eugenio, 1946-. II. Zecchin, Karina Gottardello. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Fatty acid synthase inhibitors effects on apoptosis and mitochondrial function in non tumorigenic cells

**Palavras-chave em inglês:**

Melanocytes

Fatty acid synthesis inhibitors

Apoptosis

Mitochondria

Fatty acid synthetase complex

Proteome

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Anibal Eugenio Vercesi [Orientador]

Sérgio Akira Uyemura

Leonardo dos Reis Silveira

Jörg Kobarg

Aparecida Machado De Moraes

**Data de defesa:** 25-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**FRANCO APARECIDO ROSSATO**

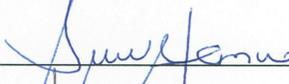
Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANIBAL EUGENIO VERCESI

**MEMBROS:**

1. PROF(A). DR(A). ANIBAL EUGENIO VERCESI



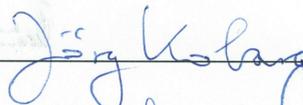
2. PROF(A). DR(A). SÉRGIO AKIRA UYEMURA



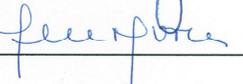
3. PROF(A). DR(A). LEONARDO DOS REIS SILVEIRA



4. PROF(A).DR(A). JÖRG KOBARG



5. PROF(A).DR(A). APARECIDA MACHADO DE MORAES



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 25 de fevereiro de 2014



O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, e coorientação da Profa. Dra. Karina Gottardello Zecchin, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 06/59786-0, 07/54639-1, 08/57471-7 e 11/50400-0), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Campinas (FAEPEX-Unicamp).



## *DEDICATÓRIA*

Aos meus queridos pais, Asmíria e Valdir, que são referências de dedicação, honestidade, humildade, determinação e esforço em minha vida e sou muito grato pelo apoio incondicional e incentivo durante toda a minha vida. Agradeço também ao meu grande e querido irmão Cristiano pela amizade, apoio e incentivo durante esse processo.

À minha querida companheira e futura esposa Mariana que compartilha os anseios e dificuldades da vida científica, que juntos parecem se suavizar. Sempre presente ao meu lado me ajudando literalmente em alguns experimentos, incentivando e compartilhando suas experiências científicas e da vida.



Ao meu orientador Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, meu profundo respeito e gratidão, por conceder a oportunidade e o privilégio da minha integração em seu grupo de pesquisa. Agradeço também pelos ensinamentos e pela profunda análise crítica dos resultados, também sou extremamente grato por me conceder a liberdade científica na escolha do tema que possibilitou a realização deste trabalho.

Sou muito grato à Profa. Dra. Karina Gottardello Zecchin, coorientadora, pelo aprendizado e ensinamentos sobre culturas de células e também pela grande ajuda no decorrer da realização deste trabalho. Agradeço também seu empenho, comprometimento, incentivo e objetividade para realizar e concluir este trabalho. Deixo aqui registrado minha grande gratidão e admiração por essa pessoa incrível.



## AGRADECIMENTOS

Ao CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro concedido ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi.

Ao Prof. Dr. Licio Augusto Velloso coordenador dos cursos de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica.

Agradeço ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, pelas suas sugestões e críticas ao longo do desenvolvimento do trabalho e também pela sua contribuição na redação e correção do manuscrito.

Prof. Dr. Edgard Graner por suas contribuições fundamentais para a realização deste trabalho, ajudando na discussão dos resultados e no delineamento experimental como também cedendo os reagentes utilizados nos experimentos de Western blot.

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino pela análise e realização da composição dos ácidos graxos livres por Espectrometria de Massas.

À Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis, que gentilmente cedeu a linhagem celular melan-a.

À Profa. Dra. Luciane Carla Alberici pelo auxílio nos experimentos de atividade de caspases -8 e -9.

À Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme e ao seu laboratório pela análise e realização do proteoma por Espectrometria de Massas.

Ao Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria e a Profa. Dra. Jacqueline Mendonca Lopes de Faria pela utilização Laboratório de Fisiopatologia Renal e Complicações do Diabetes do para a revelação dos filmes de Western Blot.

À Mariana Aparecida Brunini Rosales, pela realização da imunofluorescência e ajuda com o protocolo do Western blot.



À Rose Mara Ortega, pela realização dos experimentos de corrida dos géis (Western blot) das proteínas do ciclo celular e pela amizade.

Ao Paolo Gadioli La Guardia pela ajuda nos experimentos de respiração celular.

À Rute Alves Pereira Costa pelo auxílio, ajuda nos experimentos e pela grande amizade.

Aos integrantes do Laboratório de Bioenergética.

Aos funcionários do Laboratório de Bioenergética Márcia M. Fagian, Juliana A. Ronchi, Edilene de Souza Siqueira Santos e Roberto César Stahl.

A todos familiares que sempre acreditaram no meu esforço, tios, tias, primos e primas. Em especial agradeço aos meus avós Januário e Joana, que também são meus padrinhos, que são figuras magníficas em que sempre me espelhei ao longo da vida.

À Silvia Maria Brunini pela paciência e ajuda nos momentos finais do doutorado.

A todos que direta ou indiretamente participaram e ajudaram de alguma maneira, mesmo não estando citado acima.



## **EPÍGRAFE**

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

**(Galileu Galilei)**

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”.

**(Albert Einstein)**

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

**(George Bernard Shaw)**

"Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito".

**(Martin Luther King Jr.)**



## ÍNDICE:

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XXVII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XXIX</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>31</b>
1.1 - Ácido graxo sintase (FASN)	33
1.1.1 - Regulação da expressão de FASN	36
1.1.2 - Inibidores específicos da atividade de FASN	38
1.1.3 - Efeitos biológicos da inibição de FASN	40
1.1.4 - Efeitos dos inibidores de FASN em células não tumorais	43
1.1.5 - Inibidores de FASN e perspectivas	45
1.2 - Mitocôndrias	46
1.3 - Morte celular e disfunção mitocondrial	50
<b>2 - OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
2.1 - Objetivo geral	59
2.2 - Objetivos específicos	59
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>61</b>
3.1 - Cultura das células melan-a	63
3.2 - Cultura das células HaCaT	63
3.3 - Preparo da solução de cerulenina	64
3.4 - Preparo da solução de orlistat	64
3.5 - Citometria de fluxo	64
3.6 - Avaliação das taxas de morte celular	64
3.7 - Avaliação do ciclo celular	65
3.8 - Liberação de citocromo c	65
3.9 - Estimativa dos níveis de superóxido	66
3.10 - Detecção da atividade de caspase-9 e -8	66
3.11 - Respiração celular	67
3.12 - Atividade de citrato sintase	67
3.13 - Isolamento de mitocôndria	68
3.14 - Espectrometria de massas por ionização Electrospray (ESI-MS)	68
3.15 - Western blotting	69
3.16 - Análise por imunofluorescência	71



3.17 - Análise Proteômica	72
3.18 - Forma de Análise dos dados	73
<b>4 - CAPÍTULO I</b>	75
<b>5 - CAPÍTULO II</b>	129
<b>6 - CONCLUSÕES</b>	153
<b>7 - REFERÊNCIAS</b>	157
<b>8 - ANEXOS</b>	179

## ABREVIATURAS

7-AAD - *7-Amino-actinomycin D*

ACP - proteína carregadora de acil (*acyl carrier protein*)

ADP - adenosina difosfato

AG - ácido graxo

AIF - *apoptosis inducing factor*

AMP - adenosina 3',5'-monofosfato

ANT - translocador de nucleotídeo de adenina

APAF-1 - *apoptotic protease activating factor 1*

ATCC - *american type culture collection*

ATP - adenosina trifosfato

AV - anexina V

BSA - albumina sérica bovina

Ca<sup>2+</sup> - íon cálcio

CAT - carboxiatractilosídeo

CCCP - carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona

CDk<sub>2</sub> - *cyclin-dependent kinase 2*

CHAPS - *3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*

CoA - coenzima A

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*

D-MEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - dimetil sulfóxido

DNase - *deoxyribonuclease*

DTNB - (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico))

DTT - ditioneitol



EGCG - epigallocatequina galato  
EGF - *epidermal growth factor*  
EGTA - glico- bis (â-aminoetil éter)-N,N,N',N'- ácido tetraacético  
ErbB2 ou HER2/neu - *human epidermal growth factor Receptor 2*  
EROs - espécies reativas de oxigênio  
ESI-MS - *electrospray ionization mass spectrometry*  
FASN - ácido graxo sintase (*fatty acid synthase*)  
Fas – receptor de morte celular  
FADD - *Fas-Associated protein with Death Domain*  
FCCP - carboxicianeto-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona  
FDA - *Food and Drug Administration*  
FADH<sub>2</sub> - flavina adenina dinucleotídeo reduzido  
FITC - *fluorescein isothiocyanate*  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
HEPES - *N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N' -[2-ethanesulfonic acid]*  
HRP - *horseradish peroxidase*  
HSP60 - *heat shock protein 60 kDa*  
IAA - ácido iodoacetamida  
ICAD - Inhibitor of Caspase Activated DNase  
kDa – quilodaltons  
MAPK - *mitogen-activated protein kinases*  
MDH2 – malato desidrogenase 2  
MOMP - *mitochondrial outer membrane permeabilization*  
MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*  
NAC - n-acetil cisteína  
NAD - nicotinamida adenina dinuclotídeo (estado oxidado)  
NADP - nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado oxidado)  
NADH - nicotinamida adenina dinuclotídeo (estado reduzido)  
NADPH - nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado reduzido)  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - radical superóxido  
OH<sup>•</sup> - radical hidroxila reativo  
p21<sup>WAF1/Cip1</sup> - *cyclin-dependent kinase inhibitor 1 or CDK-interacting protein 1*  
p27<sup>Kip1</sup> - *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*  
PBS - solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)



PCA – análise de componente principal  
PARP - *poly(ADP-ribose) polymerase*  
PFT - *pifithrin-alpha*  
PI - iodeto de propideo (*propidium iodide*)  
PI3K - *phosphatidylinositide 3-kinases*  
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonilo  
PTEN - *phosphatase and tensin homolog*  
RNAi - *RNA interference*  
RNase - *ribonuclease*  
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Media 1640*  
ROCK1 - *Rho-associated protein kinase1*  
SDS - dodecil sulfato de sódio  
SFB - soro fetal bovino  
Skp2 - *s-phase kinase-associated protein 2*  
SREBP - *sterol regulatory element-binding protein*  
TFA - ácido trifluoroacético  
TMPD - tetrametil p-fenilenodiamina dihidrocloroeto N,N,N',N'  
TPM - transição de permeabilidade mitocondrial  
TPA - *12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate*  
TRADD - *tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*  
UQ - ubiquinona (forma oxidada da coenzima Q)  
UQH<sup>\*</sup> - radical ânion semiquinona  
UQH2 - ubiquinona (forma reduzida da coenzima Q)  
USF1 - *upstream stimulatory factor 1*  
USF2 - *upstream stimulatory factor 2*  
USP2-a - *ubiquitin-specific cysteine proteases 2a*  
VDAC - *voltage-dependent anion channel*  
 $\Delta\Psi$  - potencial elétrico de membrana  
 $\Delta\Psi_m$  - potencial elétrico de membrana mitocondrial  
 $\Delta\mu H^+$  - gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons



## RESUMO

Recentemente mostramos que os inibidores da enzima ácido graxo sintase (FASN - EC 2.3.1.85), cerulenina e orlistat, reduzem a proliferação e induzem apoptose em células B16-F10 de melanoma murino via mecanismos mitocondriais. Neste presente estudo investigamos os efeitos desses inibidores de FASN em linhagem celular não-tumorigênica derivada de melanoblastos de camundongos (melan-a). O tratamento *in vitro* de células melan-a com 5 µg/mL de cerulenina ou com 30 µM de orlistat inibiu a proliferação celular, com acúmulo da proteína supressora de tumor p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, assim como induziu a via intrínseca da apoptose com liberação de citocromo c e ativação de caspases-3 e -9, sem ativação da caspase-8. Os inibidores de FASN não alteram o conteúdo de ácidos graxos livres nas células melan-a, verificados por espectrometria de massas, sugerindo que o tratamento com cerulenina ou orlistat induz apoptose independente da inibição desta enzima. Análise das funções da bioenergética mitocondrial das células melan-a mostraram inibição da respiração, seguido por aumento da produção de superóxido. A inibição da respiração, promovida pelo tratamento com cerulenina ou orlistat, foi restrita à oxidação de substratos ligados a NADH (39,9% DMSO x cerulenina; ou 60,8% EtOH x orlistat) e succinato (45,8% DMSO x cerulenina; ou 51,8% EtOH x orlistat), e não foi significativa quando as mitocôndrias estavam respirando com substrato do complexo IV, N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina. A proteção conferida pelo sequestrador de radicais livres N-acetil cisteína (NAC) sugere que a disfunção mitocondrial provocada por estes compostos está associada a estresse oxidativo e é provável que seja mediada pela ação de superóxido na cadeia respiratória nos níveis de complexos de I e II. Análise proteômica de mitocôndria dessas células também mostra alterações ligadas ao estresse oxidativo. Nossos dados em conjunto sugerem que cerulenina e orlistat induzem apoptose em células não tumorais como resultado de uma disfunção mitocondrial e de maneira independente de FASN.



## ABSTRACT

We have previously reported that the fatty acid synthase (FASN) inhibitors, cerulenin or orlistat, induce apoptosis in B16-F10 mouse melanoma cells mediated by mitochondria. Here we investigate the effects of these inhibitors on the non-tumorigenic mouse cell line melan-a. Cerulenin or orlistat treatment decreased cells proliferation, accompanied by increased amounts of the tumor suppressor protein p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, as well as induced apoptosis, but not necrosis, in melan-a cell line. Mitochondrial cytochrome c release and activation of caspases-9 and -3 were detected in melan-a-treated cells. siRNAi for FASN did not culminate in apoptosis, and FASN inhibitors treatment did not alter free fatty acids content in the non-tumorigenic cells, as verified by mass spectrometry, suggesting that cerulenin or orlistat induces apoptosis independent on FASN inhibition. Analysis of energy-linked functions of melan-a mitochondria showed inhibition of respiration followed by large stimulation of superoxide production. Respiratory inhibition after cerulenin or orlistat treatment, respectively, was restricted to the oxidation of NADH-linked substrates (39.9 or 60,8%) and succinate (45.8 or 51.8%) and was not significant when mitochondria were respiring on the complex IV substrate, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylendiamine. The protection conferred by the free radical scavenger NAC suggests that the mitochondrial dysfunction caused by these compounds is associated with oxidative stress and is mediated by the action of superoxide on the respiratory chain at the levels of complexes-I and II. Proteomic analysis of mitochondria melan-a cells also indicate major changes linked to oxidative stress. Taken together, the present results show that cerulenin or orlistat induces apoptosis in non-tumorigenic cells via mitochondrial dysfunction, independent on FASN inhibition.



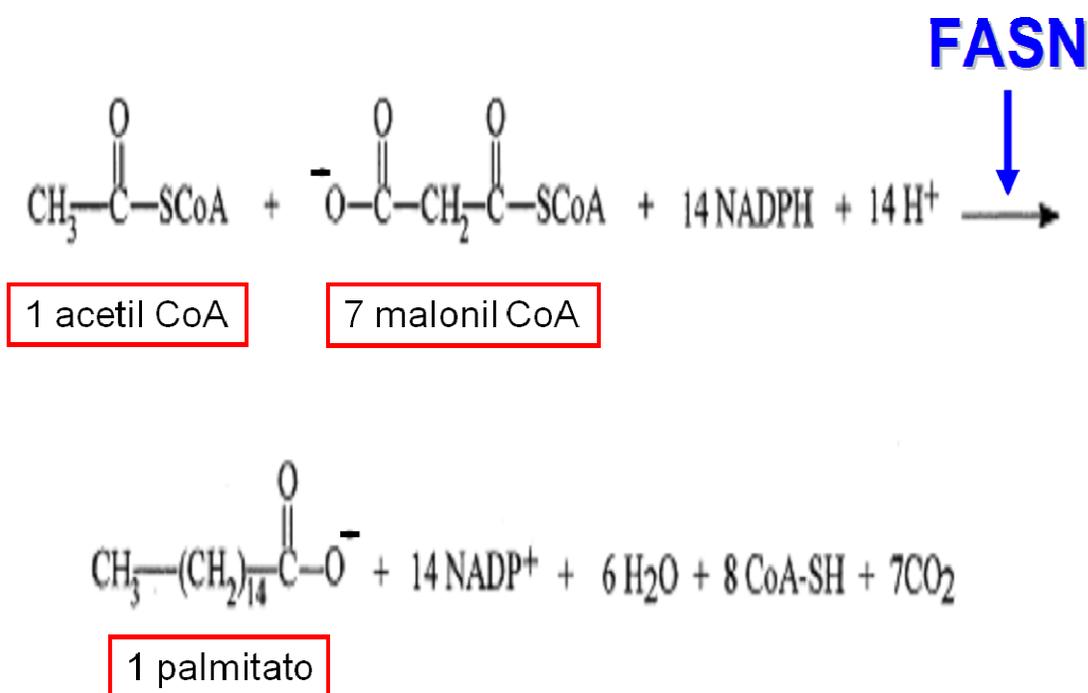
# ***INTRODUÇÃO***

---



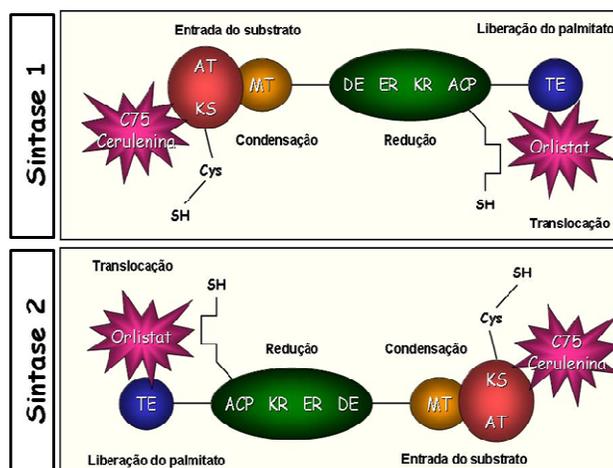
## 1.1. Ácido graxo sintase (FASN)

A ácido graxo sintase (*fatty acid synthase* – FASN, EC.3.1.85) é a enzima metabólica responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa, especialmente palmitato, a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA dependentes da ação da NADPH como doador de prótons H<sup>+</sup> (**Fig. 1**) (Stoops e Wakil, 1981; Tsukamoto, Wong *et al.*, 1983; Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000; Chirala, Jayakumar *et al.*, 2001; Rangan, Joshi *et al.*, 2001; Baron, Migita *et al.*, 2004).

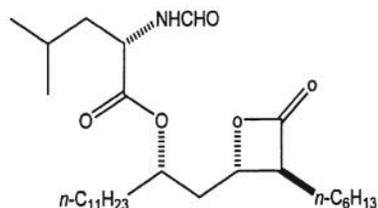


**Fig. 1** Demonstração estequiométrica de FASN, onde apenas um único acetil CoA é condensado pela enzima com malonil CoA, resultando na formação de uma cadeia de dois carbonos. Para a produção final de palmitato, a adição de seis moléculas de malonil CoA na cadeia em crescimento se faz necessária. Os subprodutos formados são: água, dióxido de carbono e íons positivos de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, NADPH (modificado a partir de Kuhajda, 2000).

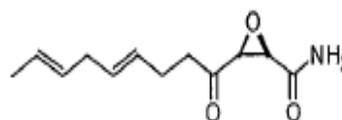
Estruturalmente o complexo multienzimático de FASN é formado por um homodímero composto por duas cadeias polipeptídicas longas, com massa molecular de ~270 kDa. Cada cadeia possui sete sítios catalíticos e um sítio para a proteína carregadora de acil (ACP, *acyl carrier protein*), distribuídos a partir da extremidade amino terminal em direção à carboxil terminal, na seguinte ordem:  $\beta$ -cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transacilases, desidratase, enoil redutase,  $\beta$ -cetoacil redutase, ACP e tioesterase (Fig. 2) (Wakil, 1989; Smith, 1994; Jayakumar, Tai *et al.*, 1995; Brink, Ludtke *et al.*, 2002; Smith, Witkowski *et al.*, 2003; Menendez, Vellon *et al.*, 2005a).



**Orlistat** (tetrahidrolipstatina, Xenical®)



**Cerulenina** ([2R, 3S], -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdeca-dienamida)



**Fig. 2** Representação do complexo enzimático de FASN e seus sítios de inibição pelas drogas cerulenina, C75 e orlistat. Sítios de FASN:  $\beta$ -cetoacil sintase (KS – *ketoacyl synthase*), acetil-CoA (AT – *acetyl transferase*) e malonil-CoA transacilases (MT – *malonyl transferase*), desidratase (DE – *dehydratase*), enoil redutase (ER – *enoyl reductase*),  $\beta$ -cetoacil redutase (KR – *ketoacyl reductase*), proteína carregadora de acil (ACP – *acyl carrier protein*) e tioesterase (TE – *thioesterase*) (modificado a partir de Menendez *et al.* 2005b).

FASN tem grande participação na formação de membranas celulares, uma vez que produz componentes como ácidos graxos e seus derivados (Chirala, Chang *et al.*, 2003). Os ácidos graxos e seus derivados são responsáveis por uma série de funções no organismo, dentre elas, a construção do isolamento de membranas celulares, a ancoragem de membranas proteicas, além de agir como mensageiros intracelulares e como forma armazenadora de energia (Kumar-Sinha, Ignatoski *et al.*, 2003; Liu, Liu *et al.*, 2010). Os ácidos graxos também existem como componentes de triacilglicerol, fosfolipídios e colesterol ou em formas livres.

A expressão de FASN na maioria dos tecidos normais é baixa ou até mesmo ausente, exceto em fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões dos recém-nascidos (Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000; Chirala, Jayakumar *et al.*, 2001; Kusakabe, Nashimoto *et al.*, 2002). A atividade alta de FASN em tecidos normais é uma exceção dos tecidos altamente lipogênicos, uma vez que na maioria dos tecidos normais a atividade dessa enzima é baixa, pelo fato da maior parte do fornecimento de ácidos graxos para a célula ser originário da dieta (Weiss, Hoffmann *et al.*, 1986; Baron, Migita *et al.*, 2004; Menendez, Vellon *et al.*, 2005b). Por outro lado, o oposto é verificado em células neoplásicas malignas, onde a maior parte dos ácidos graxos provém da síntese endógena, e esta biossíntese de ácido graxo se faz necessária para células cancerígenas tanto para sintetizar novas membranas, quanto para gerar moléculas sinalizadoras, como as fosfatidil inositol, fosfatidil serina ou fosfatidil colina, das quais são fatores extremamente importantes para ativação da proliferação e vias de sobrevivência (Fritz, Benfodda *et al.*, 2013).

Diversos são os tumores que apresentam aumento da atividade desta enzima: carcinoma de mama (Milgraum, Witters *et al.*, 1997), de ovário (Alo, Visca *et al.*, 2000), de próstata (Swinnen, Roskams *et al.*, 2002), de endométrio (Pizer, Chrest *et al.*, 1998), de tireóide (Vlad, Axiotis *et al.*, 1999), de pulmão (Piyathilake, Frost *et al.*, 2000), de cólon (Visca, Alo *et al.*, 1999), de esôfago (Nemoto, Terashima *et al.*, 2001), de estômago (Kusakabe, Nashimoto *et al.*, 2002), de bexiga (Visca, Sebastiani *et al.*, 2003), carcinoma espinocelular bucal (Krontiras, Roye *et al.*, 1999; Agostini, Silva *et al.*, 2004; Silva, Agostini *et al.*, 2004), melanoma (Innocenzi, Alo *et al.*, 2003; Kapur, Rakheja *et al.*, 2005)

e sarcomas de tecidos moles (Takahiro, Shinichi *et al.*, 2003; Rossi, Ou *et al.*, 2006). Além disso, vários trabalhos demonstram uma correlação direta entre altos níveis e atividade de FASN com um pior prognóstico em neoplasias malignas humanas, fazendo desta enzima um possível alvo terapêutico (Epstein, Carmichael *et al.*, 1995; Gansler, Hardman *et al.*, 1997; Alo, Visca *et al.*, 2000; Kuhajda, 2000; Innocenzi, Alo *et al.*, 2003; Rossi, Graner *et al.*, 2003; Takahiro, Shinichi *et al.*, 2003; Kapur, Rakheja *et al.*, 2005; Liu, Shi *et al.*, 2006; Rossi, Ou *et al.*, 2006; Menendez e Lupu, 2007). Segundo Menendez e Lupu (2007), FASN participa não somente das vias de transdução de sinais, do metabolismo, da regulação, da proliferação e sobrevivência de células tumorais, mas também modula a progressão metastática de neoplasias malignas. Além disso, já foi demonstrado que o bloqueio químico da atividade de FASN inibe a progressão do ciclo celular e induz apoptose em diversas neoplasias malignas humanas, dentre elas, o melanoma (Pizer, Jackisch *et al.*, 1996; Pizer, Wood *et al.*, 1996; Furuya, Akimoto *et al.*, 1997; Pizer, Chrest *et al.*, 1998; Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000; Li, Gorospe *et al.*, 2001; Knowles, Axelrod *et al.*, 2004; Kridel, Axelrod *et al.*, 2004; Menendez, Vellon *et al.*, 2004; Zecchin, Rossato *et al.*, 2010).

### **1.1.1 Regulação da expressão de FASN**

A regulação transcriptacional de FASN é bem caracterizada, entretanto pouco se sabe sobre sua regulação pós-translacional. Igualmente, os efeitos de hormônios e nutrientes na expressão de FASN são claros, mas seus efeitos imediatos são pouco entendidos. A expressão de FASN no fígado e no tecido adiposo é regulada pela dieta, através da insulina, glucagon, AMP cíclico, frutose, glicose, glicocorticóides e hormônio tireoideano T<sub>3</sub> (Fukuda, Iritani *et al.*, 1999). Nestes tecidos, a produção endógena de ácidos graxos é estimulada pela ingestão de carboidratos e inibida por ácidos graxos ou pelo jejum (Kersten, 2001). No tecido adiposo estes efeitos são mediados por hormônios que têm o potencial de estimular (insulina) ou inibir (leptina) a lipogênese dependente de FASN. A insulina promove a expressão de FASN através da ativação de fatores de transcrição SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein*) (Foretz, Guichard *et al.*, 1999) e USF1 e USF2 (*upstream stimulatory factors 1 and 2*) (Wang e Sul, 1995; 1997). Contrariamente, glucagon e AMP cíclico inibem o aumento da atividade de FASN

induzidos por carboidratos após o jejum em ratos (Lakshmanan, Nepokroeff *et al.*, 1972; Nepokroeff, Lakshmanan *et al.*, 1974; Paulauskis e Sul, 1989). A insulina estimula a expressão de FASN fazendo com que o excesso de glicose seja estocado como gordura nos adipócitos, enquanto a leptina inibe a atividade de FASN em resposta ao excesso de gordura presente nos adipócitos (Fukuda, Iritani *et al.*, 1999). Nos hepatócitos, além da regulação hormonal descrita, a presença de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta leva à diminuição de SREBP-1c, responsável pela regulação da síntese de colesterol (Brown e Goldstein, 1997; 1999; Horton, 2002). As SREBPs formam uma família de fatores de transcrição envolvidos na manutenção da homeostase do colesterol intracelular, no controle da síntese de ácidos graxos e na diferenciação de adipócitos (Briggs, Yokoyama *et al.*, 1993; Wang, Briggs *et al.*, 1993).

A regulação da expressão da FASN no câncer é complexa e envolve a atuação em conjunto do controle transcricional e pós-translacional com várias influências do microambiente (Kuhajda, 2000; Menendez e Lupu, 2007; Mashima, Seimiya *et al.*, 2009). Em células neoplásicas, a maior parte dos ácidos graxos é proveniente da biossíntese endógena de maneira praticamente independente da dieta (Ookhtens, Kannan *et al.*, 1984; Weiss, Hoffmann *et al.*, 1986; Menendez, Vellon *et al.*, 2005b). Desse modo, a regulação da expressão de FASN tem sido extensivamente estudada em diversas neoplasias malignas humanas. Estrógeno, progesterona, andrógenos, ErbB2 também conhecido como HER2/neu (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) interagem e são responsáveis pela ativação da cascata das vias de sinalização PI3/AKT e MAPK, com subsequente ativação transcricional de FASN, ou seja, estimulam a expressão de FASN em células de câncer de mama e de próstata (Kuhajda, 2000; Swinnen, Heemers *et al.*, 2000; Lacasa, Le Liepvre *et al.*, 2001). Esta regulação das vias de transdução AKT e MAPK é regulada através do aumento da expressão de SREBP-1c, cuja forma ativa estimula regiões regulatórias do gene promotor que codifica a FASN (Swinnen, Esquenet *et al.*, 1997; Swinnen, Heemers *et al.*, 2000; Heemers, Maes *et al.*, 2001). A observação da associação direta entre a oncoproteína ErbB2 e FASN, através da via PI-3K/Akt, que também atua sobre o promotor de FASN (Kumar-Sinha, Ignatoski *et al.*, 2003) é importante, pois uma alta expressão e/ou amplificação de ErbB2 está associada com um pior prognóstico para câncer de mama (Yarden, 2001; Kumar-Sinha, Ignatoski *et al.*, 2003;

Ross, Linette *et al.*, 2003). Além disso, a frequente perda de função do gene supressor de tumor PTEN pode ativar a via PI-3K/Akt e desempenhar um papel importante na regulação de FASN em células neoplásicas (Van De Sande, De Schrijver *et al.*, 2002; Bandyopadhyay, Zhan *et al.*, 2006). Outras vias também estão presentes no controle da expressão de FASN: a associação de proteínas de transcrição da família p53 (D'Erchia, Tullo *et al.*, 2006; Martel, Bingham *et al.*, 2006), mecanismos pós-translacionais (Shah, Dhir *et al.*, 2006), ubiquitinação controlada por andrógenos via USP2-a (*ubiquitin-specific protease 2a*), estresse metabólico de microambiente via AMPK (Oliveras-Ferraro, Vazquez-Martin *et al.*, 2009) e hipóxia (Furuta, Pai *et al.*, 2008).

### **1.1.2 Inibidores específicos da atividade de FASN**

Alguns agentes foram descritos como inibidores de FASN como, por exemplo, cerulenina e seu análogo sintético C75, orlistat, triclosan, C93, platencimicina e alguns polifenóis como quercetina, resveratrol e epigallocatequina galato (EGCG) (Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000; Li, Gorospe *et al.*, 2001; Kridel, Axelrod *et al.*, 2004; Lupu e Menendez, 2006; Flavin, Peluso *et al.*, 2010; Pandey, Okuda *et al.*, 2011), entre outros compostos como podemos verificar na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Inibidores da enzima ácido graxo sintase com potencial terapêutico, descobertos até o momento (modificado a partir de Flavin et al. 2010).

<b>Inibidores da enzima ácido graxo sintase</b>	
<b>Pequenas moléculas inibidoras</b>	
▪ Cerulenina	
▪ C75	
▪ Orlistat	
▪ C93 (FAS93)	
▪ FAS31	
▪ C247	
▪ GSK837149A	
▪ Platensimicina	
▪ Merck 3-aryl-4-hydroxyquinolin-2(1H)-one scaffold	
▪ AstraZeneca bisamide scaffold	
<b>Polifenóis que ocorrem naturalmente</b>	
▪ Epigallocatequina	
▪ Luteolina	
▪ Taxifolin	
▪ Kaempferol	
▪ Quercetina	
▪ Apigenina	
<b>Componentes da Dieta</b>	
▪ Catequinas	
▪ Proteína de soja	
▪ Ácido graxo monoinsaturado ácido oleico (18:1n-9)	

A **cerulenina** ([2R, 3S], -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida) é um metabólito natural do fungo *Cephalosporium caerulens*, descoberto em 1960 por suas propriedades antifúngicas (Hata, Sano *et al.*, 1960), mais especificamente, a cerulenina é responsável por inibir a atividade de espécies como *Candida albicans* e *Saccharomyces sp* entre outros fungos (Sato, Nomura *et al.*, 1967; Omura, 1976). Essa droga também é um

potente inibidor irreversível e não competitivo de FASN em bactérias, leveduras e mamíferos. A inibição da atividade de FASN por cerulenina foi demonstrada por cristalografia do complexo de FASN com cerulenina em fungos, através da ligação covalente com o sítio ativo  $\beta$ -cetoacil sintase (Johansson, Wiltschi *et al.*, 2008), responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (**Fig. 2**) (Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000). Seu análogo sintético **C75** é uma pequena molécula formada por cadeia de 7 carbonos ( $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -butirolactona) e que possui efeitos inibitórios comparáveis aos da cerulenina, sendo mais estável e, portanto, apresentando melhores efeitos *in vivo* (Pizer, Chrest *et al.*, 1998; Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000).

Recentemente foi descrito que a droga **orlistat** (tetrahidrolipstatina, Xenical<sup>®</sup>, Roche, EUA), um derivado semissintético da lipstatina, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) para o tratamento da obesidade por inibir irreversivelmente as lípases gástricas e pancreáticas no interior do trato gastrointestinal (Guerciolini, 1997; Lupu e Menendez, 2006), também age como inibidor específico e irreversível do sítio catalítico tioesterase de FASN, o qual é responsável pela liberação do palmitato pela ACP (**Fig. 2**) (Kridel, Axelrod *et al.*, 2004; Menendez, Vellon *et al.*, 2005a). Recentemente foi demonstrado que o orlistat é um substrato do domínio tioesterase através de cristalografia de alta resolução (Pemble, Johnson *et al.*, 2007).

O **triclosan** (5-cloro-2-[2,4-diclorofenoxi] fenol) é um agente antiséptico utilizado em sabonetes, dentifrícios e enxaguatórios bucais, que bloqueia a atividade de FASN pela inibição do domínio enoil redutase (Liu, Wang *et al.*, 2002). Entre os **polifenóis** está a **EGCG** (epigallocatequina-3-galato) componente natural do chá verde, a qual apresenta atividade comparável a da cerulenina e do C75, por bloquear FASN no sítio  $\beta$ -cetoacil sintase (Wang e Tian, 2001).

### 1.1.3 Efeitos biológicos da inibição de FASN

Foi demonstrado previamente que o tratamento com cerulenina, C75 ou orlistat inibe a progressão do ciclo celular e induz morte celular em diversas neoplasias malignas humanas, tais como mama, próstata e estômago (Pizer, Jackisch *et al.*, 1996; Pizer, Wood *et*

*al.*, 1996; Furuya, Akimoto *et al.*, 1997; Pizer, Chrest *et al.*, 1998; Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000; Li, Gorospe *et al.*, 2001; Knowles, Axelrod *et al.*, 2004; Kridel, Axelrod *et al.*, 2004; Menendez, Vellon *et al.*, 2004; Menendez, Vellon *et al.*, 2005a). Em estudo recente, foi demonstrado que a cerulenina é também capaz de inibir o crescimento de fibroblastos gengivais humanos normais em culturas primárias (Almeida, Coletta *et al.*, 2005), assim como o orlistat reduz a taxa de proliferação de células endoteliais de cordão umbilical humano (Browne, Hindmarsh *et al.*, 2006), o que sugere uma forte associação entre o controle do ciclo celular e a atividade de FASN. Grande parte dos ácidos graxos produzidos pelas células tumorais é incorporada nos fosfolipídios de membrana e a síntese destes fosfolipídios é bloqueada quando há inibição da síntese de ácidos graxos (Jackowski, Wang *et al.*, 2000; Menendez, Vellon *et al.*, 2005b). A biossíntese de fosfolipídios é maior entre as fases G1 e S do ciclo celular, quando a membrana praticamente dobra em massa, antes da divisão celular. Portanto, a inibição de FASN leva a um acúmulo das células na fase G1 provavelmente por inibir a síntese de ácidos graxos destinados à síntese de membranas celulares (Menendez, Vellon *et al.*, 2005b). Além de inibir a síntese de ácidos graxos, o tratamento com orlistat bloqueia o ciclo celular nas fases G0/G1, inibe a expressão de ErbB2 e aumenta os níveis da proteína supressora de tumor p27<sup>Kip1</sup>, levando a apoptose (Menendez, Vellon *et al.*, 2004; Menendez, Vellon *et al.*, 2005a). Adicionalmente, foi demonstrado que em células B16-F10 derivadas de melanoma murino, o tratamento com orlistat resultou em acúmulo da proteína p27<sup>Kip1</sup>, que é uma das principais proteínas responsáveis pela repressão do ciclo celular nas fases G0/G1, ao mesmo tempo em que aumentou os níveis da proteína Skp2, responsável pela ubiquitinação e subsequente degradação proteossômica de p27<sup>Kip1</sup> (Carvalho, Zecchin *et al.*, 2008).

Os mecanismos pelos quais a inibição de FASN inibe a progressão do ciclo celular e induz apoptose não estão totalmente esclarecidos. Algumas hipóteses foram propostas e o envolvimento mitocondrial (*ver adiante*) está presente em partes deste processo. As informações disponíveis na literatura até o momento sugerem que a inibição de FASN leva a: **(1)** acúmulo do intermediário malonil-CoA que, por sua vez, inibe a enzima carnitina palmitoiltransferase-1 da membrana mitocondrial, responsável pela transesterificação de acil-CoAs de cadeia longa em acil-carnitina, que então entra na mitocôndria para ser oxidada (Bandyopadhyay, Zhan *et al.*, 2006); **(2)** acúmulo de ceramida, relacionada com a

indução da via extrínseca de apoptose (*ver adiante*) através dos receptores de morte (Bandyopadhyay, Zhan *et al.*, 2006); (3) aumento da expressão de genes pró-apoptóticos como Bax e Bak (Heiligtag, Bredehorst *et al.*, 2002; Liu, Shi *et al.*, 2006); (4) clivagem de PARP (*Poly(ADP-ribose) polymerase*), enzima nuclear envolvida no reparo de DNA e ativada na presença de danos no material genético (Menendez, Vellon *et al.*, 2005b); (5) aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs, *ver adiante*) e perda do potencial elétrico de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ , *ver adiante*) (Chajes, Cambot *et al.*, 2006); (6) liberação de citocromo c e conseqüente ativação de caspases (Heiligtag, Bredehorst *et al.*, 2002; Liu, Shi *et al.*, 2006); (7) envolvimento do gene supressor de tumor p53 (Li, Gorospe *et al.*, 2001); e (8) inibição da ativação de PI3K/Akt (Van De Sande, De Schrijver *et al.*, 2002; Liu, Shi *et al.*, 2006). Recentemente verificamos que a inibição de FASN com orlistat reduz em 50% o número de linfonodos metastáticos em um modelo animal de metástases espontâneas de melanoma, além de reduzir a proliferação e induzir a apoptose das células de melanoma B16-F10 (Carvalho, Zecchin *et al.*, 2008). A partir destes resultados, posteriormente demonstramos que, *in vitro*, a inibição específica da atividade de FASN em linhagem celular de melanoma murino, B16-F10 (i) induz a via intrínseca da apoptose, mediada pela liberação de citocromo c a partir das mitocôndrias, seguida por ativação de caspases-9 e -3. O silenciamento de FASN através de RNA de interferência (RNAi) confirmou o mecanismo de apoptose dessas células, através da detecção de liberação de citocromo c. Além disso, a morte das B16-F10 foi precedida por estresse oxidativo, conforme verificado por aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da  $[Ca^{2+}]_{cit}$  (Zecchin, Rossato *et al.*, 2010), (ii) reduz significativamente a proliferação celular através do aumento dos níveis de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> e de p27<sup>Kip1</sup> co-imunoprecipitada com cdk2, acompanhados de redução de cdk2 e Skp2, e (iii) altera a composição dos ácidos graxos livres presentes nas mitocôndrias das células B16-F10, onde verificamos que as mitocôndrias de células B16-F10 tratadas com orlistat mostram significativa redução na quantidade de ácido palmítico e de seus produtos de elongação e dessaturação, tais como ácidos araquidônico, behênico e oléico, respectivamente, através de espectrometria de massa (*electrospray ionization mass spectrometry*, ESI-MS) (Zecchin, Alberici *et al.*, 2011).

#### 1.1.4. Efeitos dos inibidores de FASN em células não tumorais

Como descrito anteriormente, vários são os trabalhos que mostram os efeitos de inibidores de FASN em células tumorais, entretanto são poucos os trabalhos que reportam os efeitos de tais inibidores em células não tumorais (Almeida, Coletta *et al.*, 2005; Browne, Hindmarsh *et al.*, 2006; Silva, Cunha *et al.*, 2008). A literatura sugere que as células “normais” são mais resistentes à ação citotóxica dos inibidores de FASN (Pizer, Jackisch *et al.*, 1996; Pizer, Pflug *et al.*, 2000; Pizer, Thupari *et al.*, 2000; Zhang, Guo *et al.*, 2005). Além disso, os inibidores de FASN têm mostrado efeito antitumoral significativo, sem apresentar toxicidade para a proliferação de tecidos normais como medula óssea, pele, fígado e trato gastrointestinal (Pizer, Pflug *et al.*, 2000; Pizer, Thupari *et al.*, 2000).

Pizer e colaboradores (1996) mostraram que o tratamento com 5 µg/mL de cerulenina por 72 h inibe o crescimento de células humanas OVCAR-3 de câncer de ovário, mas não de linhagem celular controle, derivada de fibroblastos de pele humana (JW, *Non transformed Human Skin Fibroblasts Line*). O crescimento de fibroblastos derivados de cultura primária de gengiva de indivíduos normais não foi alterado após o tratamento com 2,5 µg/mL de cerulenina, em comparação com células TCA-83 de carcinoma espinocelular de língua (Zhang, Guo *et al.*, 2005). Helligtag e colaboradores (2002) mostraram que tanto fibroblastos (NHLF, *Normal Human Lung Fibroblasts*), quanto queratinócitos (NHEK, *Normal Human Epidermal Keratinocytes*) normais humanos são resistentes aos efeitos apoptóticos da cerulenina, mesmo em células tratadas com 15 µg/mL do inibidor de FASN no período de 12 h (Heiligttag, Bredehorst *et al.*, 2002). Zhao e colaboradores (2006) demonstraram que a toxicidade da cerulenina, com variações nas concentrações de 0,5 a 10 µg/mL no tratamento, é seletiva para células de glioma humano, uma vez que as mesmas apresentaram diminuição da viabilidade celular, enquanto astrócitos normais, derivados de cultura primária de ratos, permaneceram inalterados após o tratamento por 24 a 144 h (Zhao, Kridel *et al.*, 2006).

Células normais derivadas de epitélio bovino não apresentaram nenhum efeito após tratamento com orlistat, mesmo em altas concentrações (200 a 500 µM), diferentemente de

células NUGC-3 de câncer gástrico humano, as quais sofreram autofagia transitória, no período de 2 h (Dowling, Cox *et al.*, 2009).

Recentemente foram avaliados os efeitos antiproliferativos dos inibidores de FASN cerulenina, triclosan e orlistat em células de retinoblastoma, Y79 e em linhagens não neoplásicas 3T3, derivadas de fibroblastos de embrião de rato e células gliais de Müller (MIO-M1), derivadas da retina neural. O tratamento com inibidores de FASN nas células não neoplásicas, 3T3 e MIO-M1, induziu perda de até 25% de viabilidade, enquanto que nas células neoplásicas Y79 a toxicidade foi superior a 50%. Estes dados sugerem certa seletividade dos inibidores de FASN para as células de retinoblastoma em relação às células controles não neoplásicas (Deepa, Vandhana *et al.*, 2012).

Apesar dos trabalhos acima mostrarem que o tratamento com inibidores de FASN não apresenta efeitos significativos de morte celular e/ou redução do crescimento em células “normais”, em trabalho recente da literatura foi demonstrado que o tratamento com cerulenina reduziu significativamente a proliferação de fibroblastos normais em culturas primárias avaliada no período de 24 a 96 h, a partir de 5 µg/mL (Almeida, Coletta *et al.*, 2005). Browne e colaboradores (2006) também mostraram efeitos antiproliferativos, agora utilizando baixas concentrações de orlistat (1 a 5 µM) em linhagem HUVEC, de células endoteliais normais. Nesse estudo, orlistat primeiramente inibiu a proliferação celular após 24 h de tratamento, resultando em apoptose no período posterior analisado, de 48 h. Seguin e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento de células endoteliais RAEC, derivadas de aorta de coelhos, com os inibidores de FASN, 0,75 µg/mL de cerulenina e 100 µM de orlistat, diminuí significativamente a proliferação e induziu apoptose celular. Entretanto, esse mesmo tratamento na linhagem HUVEC, derivada de células endoteliais e cordão umbilical humano, não afetou a viabilidade celular, talvez pelo fato destas células apresentarem baixas taxas de replicação em comparação com as RAECs (Seguin, Carvalho *et al.*, 2012). Estes estudos sugerem que a produção endógena de ácidos graxos não seja essencial somente para as células malignas.

### 1.1.5 Inibidores de FASN e perspectivas

Nos últimos 15 anos, FASN aparece como um alvo atrativo para a terapia do câncer, e, de fato, a relevância de FASN tem sido confirmada após seu silenciamento com RNAi (De Schrijver, Brusselmans *et al.*, 2003; Menendez, Lupu *et al.*, 2005). Primeiramente estudos demonstram que pequenas moléculas como cerulenina, C75 e orlistat são capazes de induzir apoptose em diversas linhagens de células de câncer e retardar o crescimento de tumores em diversos modelos de câncer xenográfico, no entanto, os mecanismos envolvidos não estão totalmente esclarecidos. Estas moléculas têm vários pontos negativos como seletividade, alterações no metabolismo e limitações farmacológicas que dificultam o seu uso pré-clínico e em situações clínicas. Novos inibidores de FASN recentemente foram reportados na literatura científica e de patentes que atestam a atividade nesse campo. A superexpressão de FASN em diversas lesões pré-invasivas indicam a potencial utilização dos inibidores de FASN para quimioprevenção (Milgraum, Witters *et al.*, 1997; Piyathilake, Frost *et al.*, 2000; Kusakabe, Nashimoto *et al.*, 2002; Kearney, Pretlow *et al.*, 2009). A manipulação da dieta pode se tornar viável na terapêutica anti-neoplásica, uma vez que catequinas do chá verde inibem FASN sem estimulação da ativação cruzada da oxidação de ácidos graxos, assim como induzem perda de peso (Puig, Relat *et al.*, 2008; Puig, Vazquez-Martin *et al.*, 2008). Adicionalmente, resultados prévios demonstraram que a dieta com proteína de soja diminui os níveis de insulina circulantes e a expressão de FASN no cólon, atenuando danos ao DNA induzidos pela insulina. Este efeito anti-apoptótico mediado por FASN durante a carcinogênese resulta na redução do estado tumorigênico geral (Xiao, Su *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que o tratamento com o principal ácido graxo monoinsaturado encontrado no azeite de oliva, o ácido oleico (18:1n9), presente na dieta mediterrânea, tem efeitos antitumorais por bloquear e diminuir a expressão de FASN (Menendez e Lupu, 2006).

Futuramente, se os inibidores de FASN forem suficientemente toleráveis e amplamente disponíveis estudos serão necessários para identificar os pacientes candidatos a essa terapêutica. Um estudo epidemiológico recente sugere uma interação entre a obesidade e o impacto da FASN, de tal forma que os efeitos deletérios desta enzima sobre a sobrevivência parecem ser mais pronunciados em pacientes obesos. Especificamente, Ogino e

colaboradores (2008) observaram que o aumento da expressão de FASN em tumores de cólon foi associado com o aumento da mortalidade em paciente com índice de massa corpórea elevado, mas não naqueles com índices baixos (Ogino, Nosho *et al.*, 2008). Estas evidências epidemiológicas levantam a possibilidade de que os homens que são obesos e cujos tumores expressam altos níveis de FASN devem ser primeiramente selecionados para ensaios com inibidores de FASN quando isso se tornar disponível.

## 1.2. Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas responsáveis por realizar diversas funções, tais com: (i) conversão de energia de óxido-redução em energia química utilizável pelos processos celulares, ou seja, produção de ATP; (ii) está diretamente envolvida com as vias de sinalização de ciclo celular e morte celular como apoptose e necrose; (iii) participam no estresse oxidativo através da produção de espécies reativas do oxigênio; (iv) e ainda sua disfunção está associada a diversas patologias como Diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e no processo de envelhecimento (Figueira, Barros *et al.*, 2013).

Estão presentes em quase todas as células eucarióticas de animais e vegetais, com dimensões da ordem de grandeza de 1  $\mu\text{m}$ . Estruturalmente é constituída por duas membranas e dois compartimentos por elas limitados. O compartimento mais interno, delimitado pela membrana mitocondrial interna, é denominado de matriz mitocondrial e contém enzimas do ciclo de Krebs, da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, da oxidação de aminoácidos, o complexo piruvato desidrogenase e muitas outras enzimas. O segundo compartimento, cujo volume é diminuto, é denominado espaço intermembranar por estar localizado entre as membranas interna e externa. (Vercesi, 2003).

A permeabilidade da membrana mitocôndrial é distinta entre as membranas, a externa é permeável a pequenas moléculas e íons que se movem livremente através de canais transmembranas formados por uma família de proteínas integrais de membranas chamadas porinas (Nelson e Cox, 2002). Em contrapartida, na membrana interna onde são encontrados os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase é impermeável à maioria das moléculas pequenas e a íons, incluindo prótons ( $\text{H}^+$ ), sendo permeável somente

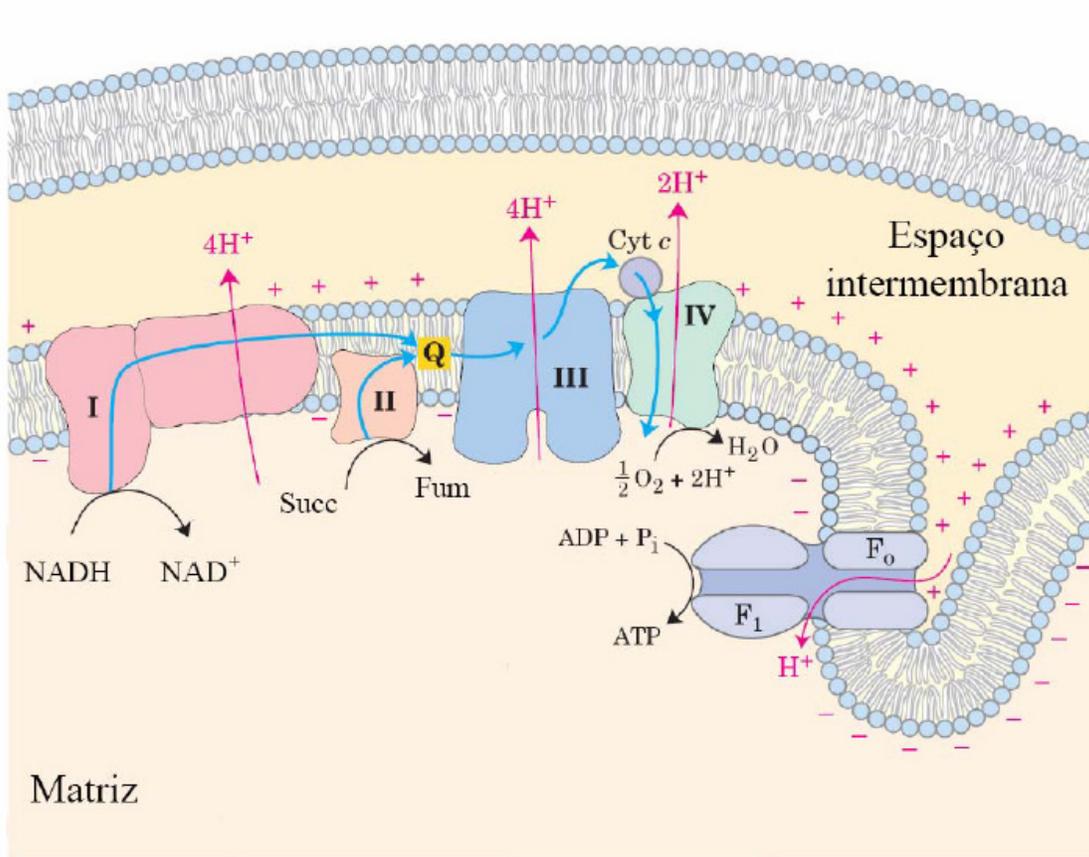
a  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NO$  e  $H_2O$ . As únicas espécies que atravessam a membrana interna são aquelas para as quais existem transportadores específicos, como por exemplo,  $ATP^{4-}$ ,  $ADP^{3-}$ , piruvato,  $Ca^{2+}$  entre outros (Nicholls e Ferguson, 2002).

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém da diferença de potencial de óxido redução entre  $NADH$  e  $O_2$ . Segundo Peter Mitchel, a passagem dos elétrons retirados dos substratos respiratórios pela cadeia respiratória é um processo exergônico cuja energia livre resultante é convertida em um potencial eletroquímico de  $H^+$  através da membrana mitocondrial interna. Esta energia é utilizada pela ATP sintase para fosforilar  $ADP$  à  $ATP$  (Mitchell, 1961).

Normalmente, elétrons provenientes das coenzimas  $NADH$ , reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à  $NADH$  desidrogenase (complexo I, **Fig. 3**). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima  $Q$  ( $UQ$ ), gerando a forma reduzida desta coenzima ( $UQH_2$ ). Elétrons originados a partir do succinato passam para a  $UQ$  através do complexo II, resultando também na redução da coenzima  $Q$ . Em alguns tecidos a coenzima  $Q$  pode também ser reduzida pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxireductase (como resultado da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos). A  $UQH_2$  é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona ( $UQH^{\bullet}$ ), a forma que doa elétrons ao citocromo  $c$ . Existem dois conjuntos separados de  $UQH^{\bullet}$ , um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de  $UQH^{\bullet}$  são oxidadas juntas, regenerando  $UQ$  e doando elétrons para o citocromo  $c$ . O citocromo  $c$  transfere elétrons à citocromo oxidase (complexo IV). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons ao oxigênio molecular, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (Nicholls e Ferguson, 2002).

Segundo Mitchell (1961), a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de  $H^+$  da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas, contra um gradiente de concentração. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a utilização desta energia. O componente elétrico ( $\Delta\Psi$ ) deste

potencial atinge valores de aproximadamente 180 mV, no estado de repouso, enquanto o componente químico ( $\Delta\text{pH}$ ) oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de  $\text{H}^+$  através da  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, estaria diretamente acoplado à produção de ATP a partir da fosforilação do ADP.



**Fig. 3 Esquema simplificado da cadeia respiratória e da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria.**

Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto um gradiente químico ( $\Delta\text{pH}$ ) quanto elétrico ( $\Delta\psi$ ). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem retornar a matriz através de canais específicos de prótons ( $\text{F}_o$ ) do complexo  $\text{F}_1\text{F}_o$ ATP sintase. A força próton-motora que impulsiona os prótons de volta para a matriz fornece a energia para a síntese do ATP, catalisada pelo complexo  $\text{F}_1$  associado ao  $\text{F}_o$  (modificado a partir de Nelson e Cox 2002).

A geração de um gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) é um elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente este mecanismo é fundamental, já que é aproveitado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias, quanto na fotossíntese de ATP em cloroplastos. Além disso, este gradiente pode ser usado diretamente para processos endergônicos sem a participação de ATP. São exemplos deste mecanismo de acoplamento direto as trocas eletroforéticas de  $\text{ATP}^{4-}$  por  $\text{ADP}^{3-}$  (Klingenberg e Nelson, 1994) e a captação eletroforética de  $\text{Ca}^{2+}$ , que transporta duas cargas positivas ao interior da mitocôndria (Gunter, Yule *et al.*, 2004).

O metabolismo energético das mitocôndrias é também reconhecido como o principal fonte celular de produção de espécies reativas de oxigênio na maioria das células eucarióticas (Figueira, Barros *et al.*, 2013). A passagem de elétrons pela cadeia respiratória tem como consequência a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou seja, os elétrons que entram na cadeia respiratória e não são utilizados para reduzir  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  são "perdidos" e se combinam com o oxigênio em passos intermediários da cadeia respiratória, principalmente nos complexos I e III (Turrens, 2003), promovendo a redução monoelétrica do  $\text{O}_2$ , gerando assim o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (Boveris e Chance, 1973; Liu, 1997). A geração do radical superóxido pode ocorrer em pelo menos cinco sítios na cadeia respiratória (Brand, 2010): no sítio de ligação da ubiquinona (UQ) presentes no complexo I e III, no grupo prostético da flavina no complexo I, na transferência de elétrons da flavoproteína (ETF), na UQ oxidoredutase e na glicerol-3-fosfato desidrogenase. Dentre esses sítios, três são relativamente bem caracterizados com respeito ao mecanismo de geração de oxigênio (UQo no complexo III e UQ e flavina no complexo I) e para os outros sítios as controvérsias na literatura continuam (Figueira, Barros *et al.*, 2013). As mitocôndrias possuem um sistema de defesa antioxidante que dismuta o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo este altamente permeável por membranas biológicas, podendo ser removido por antioxidantes.  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode gerar  $\text{HO}^{\bullet}$  que é altamente reativo e citotóxico, sendo que a maior parte do  $\text{HO}^{\bullet}$  gerado, *in vivo*, provém da reação chamada de reação de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^{\bullet} + \text{HO}^- + \text{Fe}^{3+}$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1992).

As EROs geradas na mitocôndria podem oxidar macromoléculas na própria organela ou em outros sítios intracelulares. Proteínas, principalmente da membrana

mitocondrial interna, são alvos primários de danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Esses danos envolvem a formação de grupos carbonila e a oxidação de grupos tióis. Este último pode levar à permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), tornando-a gradativamente permeável a prótons, íons e pequenas proteínas de até 1500 Da (Kowaltowski, Castilho *et al.*, 2001).

### **1.3. Morte celular e disfunção mitocondrial**

A morte celular por apoptose difere da morte por necrose com base em diversos aspectos bioquímicos e morfológicos. A apoptose está relacionada com insultos celulares mais amenos, que não resultam em inflamação e sua ativação depende da produção energia, ATP, ativação de caspases e outros fatores pró apoptóticos. A morfologia da apoptose é caracterizada pela integridade das organelas celulares, incluindo a da mitocôndria. A ativação de caspases deflagra uma serie de fatores que permite a cleavagem de substratos específicos, que causam as principais características da apoptose, tais como: ICAD (Enari, Sakahira *et al.*, 1998) e Acinus (Sahara, Aoto *et al.*, 1999), responsáveis pela fragmentação do DNA e a condensação nuclear, enquanto p21 quinase ativada (Rudel, Zenke *et al.*, 1998), gelsolin (Kothakota, Azuma *et al.*, 1997) e ROCK-1 (Coleman, Sahai *et al.*, 2001) formam *blebbings* nas membranas e os corpos apoptóticos. Por outro lado, a necrose está relacionada a intesas agressões nas células associadas com a inflamação, processo que resulta na queda da produção de ATP e ou lesão da membrana celular, morfológicamente caracterizada por: tumefação, rompimento celular e das organelas, particularmente das mitocôndrias, aparecimento de vacúolos, acidofilia citoplasmática e, em suas etapas finais, a necrose é responsável pela degradação total das células (Mcconkey, 1998; Elmore, 2007; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009).

Conforme citado anteriormente, a inibição de FASN em células tumorais diminui a proliferação celular e induz morte celular por apoptose (Pizer, Jackisch *et al.*, 1996; Pizer, Wood *et al.*, 1996; Furuya, Akimoto *et al.*, 1997; Pizer, Chrest *et al.*, 1998; Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000; Heiligttag, Bredehorst *et al.*, 2002; Knowles, Axelrod *et al.*, 2004; Kridel,

Axelrod *et al.*, 2004; Menendez, Colomer *et al.*, 2005; Menendez, Lupu *et al.*, 2005; Menendez, Vellon *et al.*, 2005a; b; Zecchin, Rossato *et al.*, 2010), adicionalmente nosso grupo mostrou que os inibidores de FASN, cerulenina e orlistat, induzem exclusivamente apoptose, visto que a necrose e autofagia não participaram do processo de morte celular em células de melanoma murino B16-F10 (Zecchin, Rossato *et al.*, 2010).

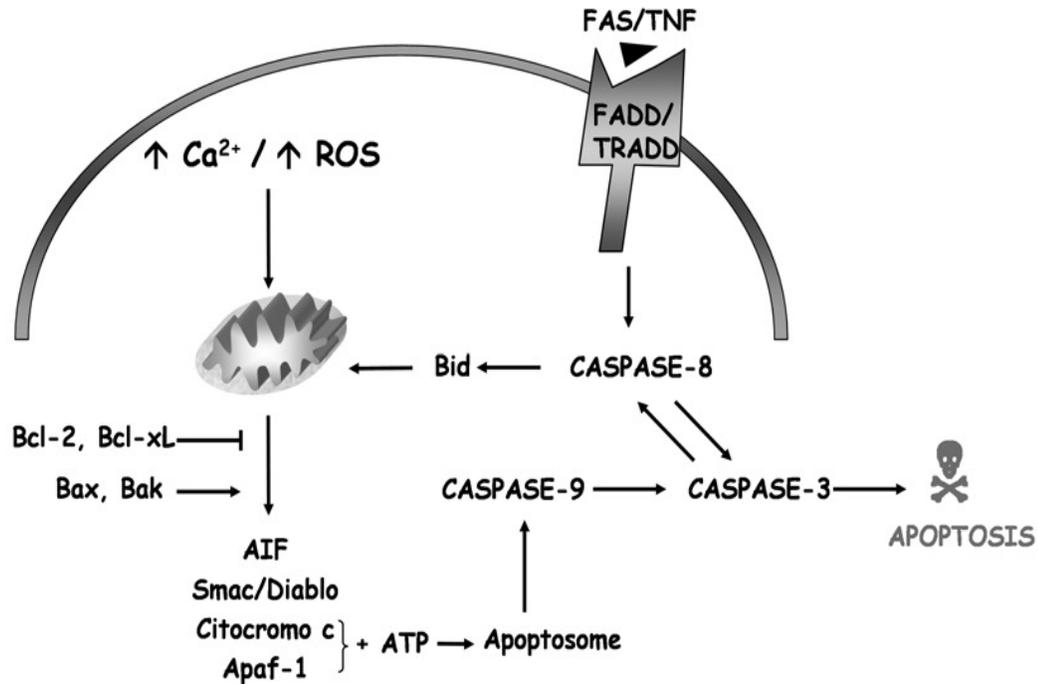
As células possuem diversos mecanismos que regulam seu crescimento e morte. A morte celular programada ou apoptose é essencial para o desenvolvimento normal de qualquer organismo multicelular, apresentando diversas funções, tais como (i) dar forma aos órgãos pela remoção de células e estruturas desnecessárias e (ii) eliminar células que não são mais necessárias, células mutadas ou com infecções virais (Westphal e Kalthoff, 2003; Yoshida, 2003). Falhas nesses mecanismos podem gerar células tumorais ou desencadear doenças autoimunes (Westphal e Kalthoff, 2003; Yoshida, 2003; Takahashi, Masuda *et al.*, 2004).

A mitocôndria, organela conhecida como usina de energia da célula, exerce papel importante nos processos de vida, bem como participa de vias de desencadeamento de morte celular, através da ativação de agentes pró apoptóticos, como (a) citocromo c (Liu, Kim *et al.*, 1996; Zimmermann, Bonzon *et al.*, 2001; Ravagnan, Roumier *et al.*, 2002), (b) caspase-9 (Susin, Lorenzo *et al.*, 1999), (c) a proteína Smac/DIABLO, que inativa um grupo de proteínas citosólicas responsáveis pela inibição de caspases (Du, Fang *et al.*, 2000; Verhagen, Ekert *et al.*, 2000; Ravagnan, Roumier *et al.*, 2002), (d) AIF (*apoptosis inducing factor*) (Zamzami, Susin *et al.*, 1996; Lorenzo, Susin *et al.*, 1999; Van Loo, Schotte *et al.*, 2001; Ravagnan, Roumier *et al.*, 2002), (e) endonuclease G (Li, Gorospe *et al.*, 2001), (f) proteínas que requerem alta temperatura (HtrA2) (Suzuki, Imai *et al.*, 2001).

Os mecanismos de apoptose envolvem uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia. Até agora, pesquisas indicam que os mecanismos de apoptose são divididos em duas vias principais, a *extrínseca* ou via dependente de receptores de morte e a *intrínseca* ou via mitocondrial (**Fig. 4**). Estas duas vias ocorrem de maneira independente, embora possa ocorrer uma interação entre ambas, (ver adiante) (Igney e Krammer, 2002; Takahashi, Masuda *et al.*, 2004). Se por um lado a via intrínseca é desencadeada na mitocôndria, a via *extrínseca* tem início com a ativação dos receptores de morte (*death*

*domains*), tais como Fas e TNF (fator de necrose tumoral), segue com a ativação da pró-caspase-8 (Kadenbach, Arnold *et al.*, 2004) e culmina com a ativação de caspases efetoras, como a caspase-3 (Polster e Fiskum, 2004; Takahashi, Masuda *et al.*, 2004). A interação entre ambas as vias pode ocorrer quando a proteína citosólica Bid, outra proteína da família Bcl-2, é clivada e translocada à mitocôndria, onde interage com a membrana e permite a liberação de citocromo c (Takahashi, Masuda *et al.*, 2004). Recentemente, verificou-se o envolvimento das mitocôndrias e caspases na apoptose induzida pela granzima B (Goping, Barry *et al.*, 2003; Sutton, Wolk *et al.*, 2003). A via *intrínseca* ou mitocondrial pode ocorrer de duas maneiras, como descrito a seguir. 1. Em resposta a estímulos pró-apoptóticos tais como (i) DNA danificado, (ii) inibidores de quinase e (iii) ativação de receptores da morte celular, a proteína Bad, da família Bcl-2, se liga ao complexo Bcl-2/Bcl-xl presente na membrana mitocondrial (Budihardjo, Oliver *et al.*, 1999; Polster e Fiskum, 2004). Esta união promove a permeabilização da membrana externa pela formação de poros entre os dímeros de Bax (Datta, Brunet *et al.*, 1999; Gross, McDonnell *et al.*, 1999). Dessa forma há efluxo mitocondrial de citocromo c e da proteína Apaf-1 para o citosol (Gross, McDonnell *et al.*, 1999; Joza, Susin *et al.*, 2001; Alirol e Martinou, 2006). No citosol, citocromo c e Apaf-1 se ligam ao dímero Bcl-2/Bcl-xl, clivando a pró-caspase-9 e formando o apoptossomo, complexo de alto peso molecular responsável pela ativação de várias pró-caspases (Scorrano e Korsmeyer, 2003; Kadenbach, Arnold *et al.*, 2004; Polster e Fiskum, 2004; Green, 2005; Garrido, Galluzzi *et al.*, 2006). Em seguida há uma sequência de clivagens promovendo a ativação proteolítica de precursores inativos das caspases, culminando na morte celular programada (Hengartner, 2000; Petronilli, Penzo *et al.*, 2001; Scorrano e Korsmeyer, 2003; Westphal e Kalthoff, 2003). Nesta situação em que a membrana mitocondrial está permeável decorrente do processo de apoptose já iniciado, se a caspase-3 se torna ativa, estudos indicam que esta ativação pode clivar diversos substratos específicos, como descrito anteriormente, dentre eles, um de suma importância para o funcionamento da mitocôndria como p75, que compõe a maior parte da subunidade do complexo I da cadeia respiratória. p75 serve de substrato da caspase-3 ativa que, por sua vez, quando clivado promove uma inibição da respiração de complexo I, orquestrando uma disfunção na cadeia de transporte de elétrons, com perda  $\Delta\Psi_m$  (Zamzami, Marchetti *et al.*, 1995; Zamzami, Susin *et al.*, 1996), inibição de complexo I e II, direcionando uma maior

produção de EROs e exarcebando ainda mais o estresse oxidativo se já implantado (Ricci, Gottlieb *et al.*, 2003; Ricci, Munoz-Pinedo *et al.*, 2004). 2. Outra via mitocondrial de apoptose ocorre quando o efluxo de citocromo c é decorrente da formação da TPM, em condições em que há aumento da concentração intramitocondrial de  $Ca^{2+}$ , como descrito adiante (Scorrano e Korsmeyer, 2003; Polster e Fiskum, 2004).



**Fig. 4. Vias de apoptose.** A via extrínseca pode ser iniciada após as interações de Fas ou TNF com seus respectivos domínios de morte FADD or TRADD. Esta via culmina na morte celular através da ativação de caspase-8 ou pode ser mediada por BID com subsequente apoptose dependente da via mitocondrial. A via intrínseca ou mitocondrial é iniciada pelo aumento da  $[Ca^{2+}]$  citosólica e produção de EROs, direcionando para TPM e/ou MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization), com liberação de fatores pró-apoptóticos, ativação de caspase-3 e morte celular (Zecchin, Inada *et al.*, 2008).

Várias condições que levam à lesão mitocondrial com comprometimento funcional, como peroxidação lipídica da membrana interna ou transição de permeabilidade mitocondrial (TPM, *adiante*), causam morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (Green e Reed, 1998; Kroemer, Dallaporta *et al.*, 1998; Lemasters, Nieminen *et al.*, 1998;

Crompton, 1999; Fiers, Beyaert *et al.*, 1999). A TPM é prevenida por redutores de tióis como o ditioneitol (DTT) (Fagian, Pereira-Da-Silva *et al.*, 1990), e estudos demonstram que bloqueadores da TPM, como a ciclosporina A, previne a morte celular em diversas condições patológicas (Di Lisa e Bernardi, 1998; Uchino, Elmer *et al.*, 1998; Lundberg e Weitzberg, 2009; Hansson, Morota *et al.*, 2011), confirmando a participação da TPM na patogênese de várias doenças.

A TPM é uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna, tipicamente promovida por dois fatores; 1. Estresse oxidativo, conforme estudos indicam que uma grande variedade de antioxidantes protege contra a TPM causada por condições distintas, sugerindo que este processo é o resultado de estresse oxidativo mitocondrial, mais especificamente, causado por espécies reativas de oxigênio (EROs) (Fagian, Pereira-Da-Silva *et al.*, 1990; Valle, Fagian *et al.*, 1993; Castilho, Kowaltowski *et al.*, 1996; Kowaltowski, Castilho *et al.*, 1996; Kowaltowski, Netto *et al.*, 1998). 2. Acúmulo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial, em um processo que pode ser estimulado ou inibido por uma variedade de compostos ou condições (Zoratti e Szabo, 1995; Lemasters, Nieminen *et al.*, 1998; Crompton, 1999; Kowaltowski, Castilho *et al.*, 2001; Gunter, Yule *et al.*, 2004; Vercesi, Kowaltowski *et al.*, 2006; Lemasters, Theruvath *et al.*, 2009; Huang, Vercesi *et al.*, 2013). Na TPM, a permeabilização da membrana mitocondrial interna resulta em perda de componentes da matriz mitocondrial, comprometimento da função mitocondrial e inchamento mitocondrial, com consequente ruptura da membrana mitocondrial externa e liberação de proteínas do espaço intermembranas (Zoratti e Szabo, 1995; Green e Reed, 1998; Lemasters, Nieminen *et al.*, 1998; Kowaltowski, Castilho *et al.*, 2001; Green e Kroemer, 2004).

As alterações de membrana que levam à TPM ainda não estão totalmente esclarecidas. A TPM induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  é um processo complexo cuja regulação é pouco compreendida ao nível molecular. Entretanto, a abertura da TPM é modulada por nicotinamida mitocondrial (NAD e NADP) e nucleotídeos de adenina (ADP, ATP) (Vercesi, 1987; Zoratti e Szabo, 1995; Crompton, 1999; Saito e Castilho, 2010; Ronchi, Figueira *et al.*, 2013). Apesar do grande avanço dos estudos desde a primeira descrição da TPM (Hunter, Haworth *et al.*, 1976), a estrutura da sua formação permanece incerta. Dados

da literatura sugerem que o poro seja uma montagem feita pela matriz, proteínas da membrana interna e externa, como: translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), *voltage-dependent anion channel* (VDAC), ciclofilina D, hexoquinase, creatina quinase e o receptor de benzodiazepina, entre outras possíveis proteínas (Beutner, Ruck *et al.*, 1998; Brdiczka, Beutner *et al.*, 1998; Halestrap, Mcstay *et al.*, 2002; Baines, Kaiser *et al.*, 2005; Lemasters, Theruvath *et al.*, 2009; Martin, 2010). Entretanto, outros estudos demonstraram que algumas dessas proteínas não são componentes essenciais da formação do poro de TPM, podendo ocorrer em partículas submitocondrial invertida, que não apresenta a matriz e a membrana externa (Fagian, Pereira-Da-Silva *et al.*, 1990); em mitoplastos, sem a membrana externa (Ronchi, Vercesi *et al.*, 2011); e em mitocôndrias geneticamente deficientes em ANT, VDAC e ciclofilina D (Kokoszka, Waymire *et al.*, 2004; Baines, Kaiser *et al.*, 2005; Krauskopf, Eriksson *et al.*, 2006). Enquanto o ADP e NADP reduzido são inibidores notáveis do poro de TPM, o desequilíbrio redox é o principal fator que facilita a abertura do poro de TPM *in vitro* e em uma variedade de condições patológicas (Crompton, 1999; Kowaltowski, Castilho *et al.*, 2001; Figueira, Barros *et al.*, 2013). O papel da ciclofilina D na TPM tem recebido grande atenção. A ablação ou o direcionamento farmacológico dessa proteína desensibiliza a mitocôndria na TPM induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Baines, Kaiser *et al.*, 2005). Recíprocamente, níveis elevados da expressão de ciclofilina D estão associados ao aumento da suscetibilidade da TPM induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Naga, Sullivan *et al.*, 2007; Figueira, Castilho *et al.*, 2011). Modificações pós-translacionais da ciclofilina D, conhecidas como nitrosilação de cisteína ou ligação da p53, surgiram como os principais eventos de sinalização no estresse oxidativo estimulado por  $\text{Ca}^{2+}$  na indução da abertura do poro da TPM (Nguyen, Stevens *et al.*, 2011; Vaseva, Marchenko *et al.*, 2012).

Considerando-se que:

- ✓ em estudo prévio mostramos que a inibição farmacológica de FASN induz apoptose em células B16-F10 de melanoma murino,
- ✓ fibroblastos de gengiva normal mostraram redução da proliferação após o tratamento com inibidores de FASN e (Almeida, Coletta *et al.*, 2005),
- ✓ pouco se sabe sobre os efeitos dos inibidores de FASN em células “normais”,
- ✓ e que nossos dados iniciais mostraram que a cerulenina ou orlistat induz apoptose também em células “normais”, através de mecanismo desconhecido,

o presente estudo teve como objetivo principal caracterizar o envolvimento mitocondrial na apoptose induzida pelos inibidores de FASN, orlistat e cerulenina, em células derivadas de melanoblastos de camundongo (melan-a).

## ***OBJETIVOS***

---



## 2.1 - Objetivo geral

O presente trabalho visa estudar os mecanismos mitocondriais envolvidos na apoptose de células derivadas de melanoblastos de camundongo (melan-a) após tratamento com inibidores de FASN, cerulenina e orlistat.

## 2.2 - Objetivos específicos

2.2.1 - Avaliar a ação de cerulenina e orlistat sobre a proliferação e o ciclo celular das células melan-a. **Capítulo I**

2.2.2 - Avaliar a liberação de citocromo c na morte de células melan-a induzida pelos inibidores de FASN, cerulenina e orlistat, assim como a ativação de caspases -3, -8 e -9. **Capítulo I**

2.2.3 - Analisar os efeitos de cerulenina e orlistat na função bioenergética mitocondrial de células melan-a, através do consumo de  $O_2$  contendo substratos NAPH dependentes, succinato e TMPD/ascorbato, assim como verificar a influência desses inibidores na produção de espécies reativas de oxigênio. **Capítulo I**

2.2.4 - Analisar os efeitos do tratamento da cerulenina ou orlistat no conteúdo de ácidos graxos livres de mitocôndrias isoladas das células melan-a por meio de espectrometria de massas. **Capítulo I**

2.2.5 - Verificar o perfil do proteoma de mitocôndrias isoladas das células melan-a após tratamento com os inibidores de FASN. **Capítulo II**



## ***MATERIAIS e MÉTODOS***

---



### **3.1- Cultura das células melan-a:**

A linhagem celular melan-a é a primeira linhagem não tumorigênica conhecida derivada de melanoblasto de camundongo (Bennett, Cooper *et al.*, 1987) e foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis (Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP). As células foram cultivadas em frascos plásticos de 75 cm<sup>2</sup> (Sarsdetd, Santana do Parnaíba, São Paulo, Brasil), em meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell), 200 nM de 12-*o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate* (TPA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 100 µg/mL de gentamicina (Vitrocell), 100 IU/mL de penicilina (Vitrocell) e 100 mg/mL de estreptomicina (Vitrocell), a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias, sempre se observando o pH do mesmo e a confluência das culturas, para que não houvesse falta de substratos, nem de ácidos graxos provenientes do meio de cultura e do SFB. As células utilizadas nos experimentos foram subcultivadas sempre que atingiram uma confluência de 70-80%, aproximadamente. Para isso, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) e então, incubadas a 37°C com tripsina a 2% e EDTA a 0,02%, em PBS. Após o completo descolamento das células (cerca de 1-5 min), a ação da tripsina foi interrompida pela adição de RPMI 1640 contendo 10% de SFB. As células foram centrifugadas a 2,000 xg por 4 min, ressuspensas em novo meio de cultura contendo 5% de SFB, contadas em hemocitômetro e semeadas em novos frascos plásticos. As células foram mantidas em nitrogênio líquido em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) e 90% de SFB. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as linhagens subcultivadas por, no máximo, dez passagens a cada descongelamento e então, descartadas.

### **3.2 - Cultura das células HaCaT:**

A linhagem celular não tumorigênica HaCaT, derivada de queratinócitos humanos de pele foi adquirida da *Cell Line Service* (CLS, Heidelberg, Alemanha). Estas células foram cultivadas em meio de cultura DMEM contendo alta glicose (Vitrocell), 10% de SFB e antibióticos, da mesma maneira descrita para as células melan-a.

### **3.3- Preparo da solução de cerulenina:**

Cerulenina (Sigma) foi dissolvida em DMSO para uma concentração final estoque de 20 mg/mL, separadas em pequenas alíquotas, as quais foram armazenadas a -20°C. As células do grupo controle foram tratadas com o mesmo volume de DMSO.

### **3.4- Preparo da solução de orlistat:**

O composto ativo do orlistat (Xenical<sup>®</sup>, Roche, Suíça) foi extraído de acordo com Knowles e colaboradores (2004). O conteúdo de 1 cápsula foi dissolvido em 1 mL de etanol absoluto (EtOH), seguindo de agitação por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 12,000 xg por 5 min e o sobrenadante, com uma concentração estoque de 250 mM, foi estocado em pequenas alíquotas a -80°C até o momento do uso. As células do grupo controle foram tratadas com o mesmo volume de EtOH.

### **3.5 - Citometria de fluxo:**

Cerca de 10<sup>6</sup> células/mL foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). As populações celulares foram identificadas por suas características de tamanho e granulosidade e analisadas separadamente por intensidade de fluorescência das sondas específicas.

### **3.6 - Avaliação das taxas de morte celular:**

A porcentagem de células em apoptose e necrose foi determinada por citometria de fluxo, em canais FL1 e FL2, após a marcação com Anexina V (Invitrogen, CA, EUA) e com 7-AAD (*7-Amino-actinomycin D*, Molecular Probes, Invitrogen), respectivamente. Após os tratamentos, as células foram incubadas com 0,2 µg/µL de Anexina V-FITC ou com 20 µg/µL de 7-AAD em tampão de ligação contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>, no escuro, por 20 min, a temperatura ambiente e analisadas em citometria de fluxo (Zecchin, Rossato *et al.*, 2010).

### 3.7 - Avaliação do ciclo celular:

As células foram semeadas em placas de 6 poços ( $2,5$  a  $6,5 \times 10^4$  células/mL). Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco não suplementado, ou seja, na ausência de SFB, a fim de se promover o sincronismo (parada em G0/G1) das células. Após mais 24 h, o meio de cultura foi novamente trocado e as células foram tratadas com cerulenina por 18 h ou com orlistat por 36 h, na presença de meio de cultivo suplementado com SFB. Após os tratamentos as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 200  $\mu$ L de etanol a 70% e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  por, no mínimo, 24 h. Após este período as células foram centrifugadas, ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS com 10  $\mu\text{g/mL}$  de RNase (Sigma) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 1 h. As células foram centrifugadas e marcadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de iodeto de propídeo (200  $\mu$ L) por 2 h a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, as células foram lidas em canal FL2, em citômetro de fluxo e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o programa ModFit™ (Becton Dickinson, ME, EUA) (Carvalho, Zecchin *et al.*, 2008; Zecchin, Rossato *et al.*, 2010).

### 3.8 - Liberação de citocromo c:

A análise da porcentagem de citocromo c presente dentro das mitocôndrias das células melan-a foi verificada em citometria de fluxo, segundo protocolo descrito por Campos e colaboradores (2006). Após tratamento com 5  $\mu\text{g/mL}$  de cerulenina ou com 30  $\mu\text{M}$  de orlistat por 12 ou 24 h, respectivamente as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio mitocondrial (125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM HEPES (pH 7,2), 0,5 mM de EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  e 2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) suplementado com 1 mM de *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF), 1% de coquetel de inibidores de protease (Sigma) e digitonina a uma concentração final de 0,0001%. Cada amostra foi homogeneizada a temperatura ambiente, com rápidas passagens em vórtex, até que os controles apresentassem cerca de 50 a 60% de inviabilidade em azul de tripan 0,1%. As células foram então centrifugadas a 1000  $\times g$  por 3 min, a  $4^\circ\text{C}$  e, em seguida, fixadas em 500  $\mu$ L de paraformoldeído 3,7% por 20 min a temperatura ambiente. Após fixação, as células foram centrifugadas, lavadas em PBS e incubadas 15 min com 500  $\mu$ L meio de ligação (SFB a 2%, azida sódica a 0,2% e Triton-X-100 a 0,5% em PBS), seguido de incubação com anticorpo primário contra citocromo c (1:500, 6H2.B4, Promega, WI,

EUA), por 1 h a 4°C. Logo após, as células foram lavadas e marcadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (1:200, Vector Laboratories, CA, EUA) e lidas em canal FL1 em citômetro de fluxo (Campos, Paim *et al.*, 2006).

### **3.9 - Estimativa dos níveis de superóxido:**

As células melan-a foram semeadas ( $4,75 \times 10^4$ /mL) em placas de 6 poços e, após 24 h de adesão, as células foram tratadas com 5 µg/mL de cerulenina ou com 30 µM de orlistat durante 24 e 48 h, respectivamente. Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultivo sem SFB, para determinação das EROs mitocondriais, mais especificamente, superóxido (Payne, Weber *et al.*, 2007), e incubadas com 5 µM de MitoSox (Molecular Probes) a 37°C por 10 min e lidas em canal FL2 (Zecchin, Seidinger *et al.*, 2007; Zecchin, Rossato *et al.*, 2010).

### **3.10- Detecção da Atividade de Caspases-9 e -8:**

Células melan-a tratadas ( $3 \times 10^6$ ) foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lise refrigerado (20 mM de HEPES pH 7.5, 250 mM de sacarose, 2 mM de MgCl e 1 mM de EDTA) contendo 0,5 mM de DTT. A suspensão celular foi sonicada (Mostonix Sonicator S-3000, New Highway Farmingdale, USA) e em seguida congeladas em -80°C. O lisado de células foi descongelado, centrifugado a 15,000 g durante 30 min, coletado o sobrenadante foram adicionados 200 µL de meio de reação (25 mM HEPES pH 7.5, 10% de sacarose e 0,1% de CHAPS) contendo 10 mM de DTT. As reações foram iniciadas pela adição de substratos para caspase-8 e -9, respectivamente 0,1 mM de Ac-LETD-AFC (Sigma) ou 0,2 mM de LEHD-p-nitroanilina (Calbiochem), e incubada a 37°C durante 1,5 h conforme descrito por Zecchin e colaboradores (2010). A atividade da caspase-8 foi medida pela fluorescência de AFC livre usando Hitachi F4500 spectrofluorometer (Hitachi High-Tech, Japan) com excitação e emissão no comprimento de ondas de 400 e 505 nm, respectivamente, com slit na largura de 5 nm. As células foram tratadas com 1,25 µg/ml cicloheximida (Sigma) e 10 nM de fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ , Peprotech, USA) durante 20 h e foram usadas como controle positivo. A atividade de caspase-9 foi medida pela absorvância de p-nitroanilina livre usando Varian Cary 50 spectrophotometer (Biocompare, USA) a 405 nm (Zecchin, Rossato *et al.*, 2010).

### 3.11- Respiração Celular:

O consumo de oxigênio produzido pelas células melan-a foi determinado após os tratamentos com 5 µg/mL de cerulenina ou com 30 µM de orlistat durante 24 e 48 h, respectivamente, através do respirômetro de alta resolução Oroboros (Innsbruck, Austria) em uma câmara fechada equipada com um agitador magnético e temperatura controlada a 37°C (Vercesi, Rodrigues *et al.*, 1998; Sirvent, Bordenave *et al.*, 2005; Oliveira, Zecchin *et al.*, 2008). Cerca de  $2 \times 10^6$  de células viáveis/mL, foram adicionadas a 2 mL de meio de reação contendo 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 2,0 mM  $K_2HPO_4$ , 1,0 mM  $MgCl_2$  (pH 7,2), 50 µM EGTA, 0,01% BSA e substratos de complexo I: 2,0 mM malato, 1,0 mM  $\alpha$ -cetogluturato, 1,0 mM piruvato e 1,0 mM glutamato. Em seguida, foram adicionados 15 µM de digitonina para permeabilização e as análises da fosforilação oxidativa e respiração das mitocôndrias foram realizadas pela adição sequencial de 300 µM ADP, 2 µg/ml oligomicina, 100 nM carboxicianeto-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP), 5 mM succinato, 0,5 µM antimicina e 200 µM tetrametil p-fenilenodiamina dihidrocloro N,N,N',N' (TMPD), mais 2 mM de ascorbato. Os dados foram reproduzidos e calculados pelo software específico do Oroboros. A fosforilação oxidativa foi analisada pelo cálculo do controle respiratório (CR), razão entre as velocidades de consumo de oxigênio nos estados de respiração III e IV, ou seja, respiração de fosforilação e de repouso, respectivamente.

### 3.12 - Citrato sintase:

A atividade da enzima citrato sintase em suspensão celular foi medida espectrofotometricamente pela conversão de oxaloacetato e acetil-CoA em citrato e SH-CoA, catalisada pela citrato sintase, a reação foi monitorada pelo produto colorimétrico ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico ou DTNB (Zecchin, Rossato *et al.*, 2010). Frações citosólicas foram incubadas a 37°C, em tampão contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1% de Triton X-100, 250 mM de oxaloacetato, 50 mM de acetil-CoA, e 100 mM de DTNB. O aumento da absorvância no comprimento de onda 412 nm foi acompanhado por 8 min.

### 3.13- Isolamento de Mitocôndrias

Foram semeadas em placas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Sarsdetd, São Paulo, Brasil) cerca de 2,0 x 10<sup>5</sup> e 1,0 x 10<sup>5</sup> das células melan-a, respectivamente para os tratamentos de cerulenina e orlistat, em 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil), suplementado como descrito anteriormente. Após 24 h de adesão, o meio foi trocado e as células foram tratadas com 5 µg/mL de cerulenina ou com 30 µM de orlistat durante 24 e 48 h, respectivamente. Após tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de PBS, mantidas no gelo e assim procedemos o isolamento de mitocôndria (Zecchin, Alberici *et al.*, 2011). A viabilidade das células foi determinada por azul de tripan, (*iten acima*) e, em seguida, foram colocadas 20 x 10<sup>6</sup> de células por mL em tubo graduado de 1,5 mL. As células foram centrifugadas a 2,000 xg durante 3 min, e ressuspensas em 400 µL de tampão (250 mM de sacarose, 2,0 mM de EDTA, e 0,1 mg/mL de BSA, pH 7,4). Foram então homogeneizadas no gelo foram em Potter de vidro (#19). O homogenato formado foi centrifugado a 4°C durante 3 min a 500 g para retirar os restos celulares, e o sobrenadante foi retirado e centrifugado durante 12 min a 16,000 xg para obtenção da fração mitocôndrial.

### 3.14 – Espectrometria de Massas por ionização Electrospray (ESI-MS)

ESI-MS foi realizado em mitocôndrias isoladas de células melan-a como descrito previamente, com poucas modificações (Zecchin, Alberici *et al.*, 2011). Após o isolamento de mitocôndrias, as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) no intuito de normalizar a extração de lipídios, dos quais foram extraídos como foi descrito por (Bligh e Dyer, 1959). As amostras contendo mitocôndria foram ressuspensas em 0,1 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura e, em seguida, foram adicionados 0,5 mL da solução de metanol/tolueno (7:3 v/v) e 0,5 mL da solução metanol em amônia (0,1% v/v). Foram analisadas 16 amostras, sendo 4 das células controles e 4 das células tratadas, para cada inibidor da FASN. A análise de lipídios foi realizada usando ESI Q-TOF PREMIER (Waters) em modo negativo, acoplado com uma fonte nanoelectrospray, usando a injeção direta a uma taxa de fluxo de 10 µL/min com uma bomba Harvard Apparatus. A tensão de nanoelectrospray foi ajustada para 2,5 kV, voltagem do cone de 40 V, a temperatura da fonte de 120°C, temperatura de dessolvatação de 200°C e a energia de colisão de 10 V. O instrumento foi operado em

modo contínuo de MS e a aquisição de dados foi de  $m/z$  50-1,000 a uma taxa de varredura de 1 s e um atraso entre leituras de 0,1 s. Os dados foram analisados usando o pacote de software Masslynx 4.1. Os espectros foram acumulados mais de 6 s na região, com a estabilidade da taxa de fluxo. Os espectros foram suavizados ( $2 \times 3$  canais, Savitzky Golay liso) e os valores de centróide de massa foram obtidos utilizando-se 80% do topo do pico e uma largura mínima de pico a meia-altura de 4 canais. Análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando software MetaboAnalyst. Para a análise multivariada, as contagens espectrais nominais foram considerados até o primeiro dígito decimal. Contagens espectrais foram transformadas em um código de presença/ausência (1/0) binária, a fim de lidar com dados de uma forma qualitativa, evitando assim, a imprecisão inerente à técnica. Os dados foram auto-escalados para análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante mínimos quadrados parciais (PLS-DA). As análises foram realizadas na plataforma on-line MetaboAnalyst (Xia, Mandal *et al.*, 2009; Xia, Psychogios *et al.*, 2009) e com a ajuda do programa Piroeutte (v 4.0, Infometrix, Inc.).

### 3.15 – Western blot

Foram realizados extratos totais protéicos a partir de células melan-a tratadas, conforme descrito por Zecchin e colaboradores (2005). As células foram semeadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e soltas mecanicamente com *cell scraper* em PBS, quando atingiram 80% de confluência. As células foram imediatamente homogeneizadas em tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton-X, 20 mM de Tris (pH 8,0), 137 mM NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA (pH 8,0) e 1 mM de NaF. Os inibidores de proteinases PMSF (1 mM), inibidor de tripsina (*soybean trypsin inhibitor*) (0,1 mM), aprotinina (1 µg/mL) e leupeptina (1 µg/mL) foram adicionados ao tampão de lise imediatamente antes do uso. As células foram homogenizadas no gelo por 30 min, agitadas a cada 10 min. Após este período, o material foi centrifugado a 15,000 g por 15 min a 4°C, o sobrenadante coletado e estocado a -80°C até o momento do uso. A quantificação das proteínas totais de cada extrato foi realizada a partir do método de Bradford (1976). Em seguida, quantidades iguais de proteína total foram homogeneizadas em tampão de amostra redutor 4x concentrado contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 125 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10% de glicerol, 0,001% azul de bromofenol e 2% de beta-mercaptoetanol. As proteínas foram

desnaturadas a 100°C por 5 min e então separadas eletroforéticamente em SDS-PAGE a 10 e 15%, em tampão contendo 2,5 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 19 mM de glicina e 0,3 mM de SDS. Em seguida, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 9,6 mM de glicina e 20% de metanol. A eficácia das transferências foi verificada através da coloração das membranas com o corante Ponceau S (Sigma), seguida por bloqueio em uma solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão 20 mM Tris-HCl (pH 7,6) contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20 (TBST) por 1h a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com anticorpos primários descritos na **Tabela 2**, “overnight” a 4°C, sob agitação constante, diluídos em solução TBST. Foram então realizadas três lavagens de 15 min cada com TBST, seguidas de incubação em TBST a 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) com anticorpos secundários conjugados com HRP (Santa Cruz, EUA), por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação constante. As membranas foram novamente lavadas com TBST, conforme descrito anteriormente, e em seguida as reações foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando-se o kit de detecção ECL – SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram expostas ao equipamento Alliance 2,7 analisadas e a proteína foi quantitativamente determinada em um software específico (Uvitec Cambridge, Reino Unido). As membranas tiveram os valores normalizados pela beta-actina ou VDAC1, e os valores expressos em unidades arbitrárias, convertidos em número de vezes (Bradford, 1976; Zecchin, Pereira *et al.*, 2005).

**Tabela 2:** Relação dos anticorpos utilizados, incluindo clones, peso molecular e diluições.

Anticorpo	Clone e Marca	Peso Molecular (kDa)	Diluição
FASN	23 (BD Pharmigen)	250-270	1:3.000
p21 <sup>WAF1/Cip1</sup>	C-19 (Santa Cruz)	21	1:200
HSP60	C-10 (Santa Cruz)	60	1:500
MDH2	A-22 (Santa Cruz)	36	1:250
ANT2	D-15 (Santa Cruz)	33	1:500
VDAC1	D-16 (Santa Cruz)	30-35	1:500
Beta-actina	AC-15 (Sigma)	45	1:5.000
Goat anti-mouse	IgG-HRP (Santa cruz)	-	1:10.000
Donkey anti-goat	IgG-HRP (Santa cruz)	-	1:10.000
Goat anti-rabbit	IgG-HRP (Santa Cruz)	-	1:10.000

### 3.16 – Análise por imunofluorescência:

As células melan-a foram semeadas a uma concentração de 30.000 células/poço em um círculo lamela de vidro (12 mm de diâmetro) em placas de 24 poços (Deckglaser, Knittel Glaser, Alemanha). Após 24 h, tempo necessário para adesão celular, o meio foi completamente substituído e, em seguida, as células melan-a e foram tratadas com cerulenina 5 µg/ml ou orlistat 30 µM, durante 24 ou 48 h, respectivamente. Após os tratamentos, as células foram lavadas com solução balanceada de Hanks (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil), fixadas com paraformaldeído gelado (-20°C) na concentração de 3,7% durante 10 min à temperatura ambiente e lavada três vezes com Hanks. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com solução tampão (PBS, BSA a 2% e Tween a 0,05%) durante 1 h. Posteriormente, as células foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo anti-HSP60, derivado de camundongo e diluído na concentração de 1:50. O anticorpo secundário, Alexa 488 derivado de cabra anti-camundongo (Invitrogen, San Diego, CA, EUA) foi diluído a 1:200 e aplicado durante 1 h à temperatura ambiente. A marcação nuclear foi realizada através da marcação com DAPI. As lâminas foram

montadas com DAPI (Vector). As imagens foram adquiridas com Zeiss Axio Observer.A1 invertido (Zeiss, Alemanha) sob o campo de 630 X.

### **3.17 - Análise proteômica:**

**Preparo das amostras:** As amostras contendo mitocôndrias isoladas das células melan-a após o tratamento com os inibidores de FASN foram ressuspensas utilizando uma solução tampão de uréia 8 M (na diluição 1:1). Em seguida, as amostras foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para a análise proteômica foi utilizada uma solução de digestão aplicada a misturas complexas que consistem nas etapas a seguir: **1.** Redução das amostras com uma solução de DTT na concentração final de 5 mM incubadas durante 25 min a 56°C. **2.** Alquilação das amostras, com uma solução de IAA (iodoacetamida) na concentração final de 14 mM, incubadas durante 30 min a temperatura ambiente e protegidas da luz. **3.** Retirada da IAA livre com a adição de um solução de IAA na concentração final de 5 mM, incubadas durante 15 min a temperatura ambiente e protegidas da luz. **4.** Redução da concentração de uréia a 1,6 M com a adição de bicarbonato de amônio e CaCl<sub>2</sub> na concentração final de 50 mM e 1 mM, respectivamente. **5.** Digestão das amostras com tripsina *Sequencing grade modified trypsin V5111* (Promega, EUA) na concentração de 20 ng/mL (solução bicarbonato de amônio 50 mM) e incubadas durante 16 h a 37°C. Após a incubação, a reação enzimática foi estacionada com a adição de TFA (ácido trifluoacético) na concentração final de 0,4%, e foi verificado o pH que como esperado ficou abaixo de 2,0. **6.** Centrifugação das amostras a 13,000 xg durante 10 min a temperatura ambiente, e descarte dos peletes. Em seguida, as amostras foram liofilizadas utilizando colunas de dessalinização SepPack, C18 (Waters, Milford, MA, EUA). Após essa etapa as amostras foram secas e armazenadas a -20°C até a realização da aquisição do espectrômetro de massas ESI Q-TOF Premier (Waters).

**Análise estatística:** Os valores quantitativos, que normalizam as contagens espectrais através de amostras para cada proteína, foram comparados entre amostras controle *versus* tratadas. A variação comparada ao controle (aumentadas ou diminuídas) foi calculada dividindo as contagens médias de peptídeos identificados tratados/controle, e os valores superiores a 1,5 e inferiores a 0,5 foram considerados diferentes.

### **3.18 - Forma de análise dos dados:**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) de, pelo menos, três experimentos independentes. Os resultados foram analisados por meio de testes pareados e não paramétricos (ANOVA), considerando nível de significância de  $p < 0,05$ .



## *Capítulo I*

---



Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non-tumorigenic melan-a cells associated with inhibition of mitochondrial respiration

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non-tumorigenic melan-a cells associated with inhibition of mitochondrial respiration
Short Title:	FASN inhibitors-induced apoptosis in non-tumorigenic melan-a cells
Corresponding Author:	Anibal E Vercesi Universidade Estadual de Campinas Campinas, BRAZIL
Keywords:	cerulenin; fatty acid synthase; melan-a cells; orlistat; oxygen consumption.
Abstract:	The metabolic enzyme fatty acid synthase (FASN) is responsible for the endogenous synthesis of palmitate, a saturated long-chain fatty acid. In contrast to most normal tissues, a variety of human cancers overexpress FASN. One such cancer is cutaneous melanoma, in which the level of FASN expression is associated with tumor invasion and poor prognosis. We previously reported that two FASN inhibitors, cerulenin and orlistat, induce apoptosis in B16-F10 mouse melanoma cells via the intrinsic apoptosis pathway. Here, we investigated the effects of these inhibitors on non-tumorigenic melan-a cells. Cerulenin and orlistat treatments were found to induce apoptosis and decrease cell proliferation, in addition to inducing the release of mitochondrial cytochrome c and activating caspases-9 and -3. Transfection with FASN siRNA did not result in apoptosis. Mass spectrometry analysis demonstrated that treatment with the FASN inhibitors did not alter either the mitochondrial free fatty acid content or composition. This result suggests that cerulenin- and orlistat-induced apoptosis events are independent of FASN inhibition. Analysis of the energy-linked functions of melan-a mitochondria demonstrated the inhibition of respiration, followed by a significant decrease in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and the stimulation of superoxide anion generation. The inhibition of NADH-linked substrate oxidation was approximately 40% and 61% for cerulenin and orlistat treatments, respectively, and the inhibition of succinate oxidation was approximately 46% and 52%, respectively. In contrast, no significant inhibition occurred when respiration was supported by the complex IV substrate N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD). The protection conferred by the free radical scavenger N-acetyl-cysteine indicates that the FASN inhibitors induced apoptosis through an oxidative stress-associated mechanism. In combination, the present results demonstrate that cerulenin and orlistat induce apoptosis in non-tumorigenic cells via mitochondrial dysfunction, independent of FASN inhibition.
Order of Authors:	Franco A Rossato Karina G Zecchin Paolo G La Guardia Rose M Ortega Luciane C Alberici Rute A P Costa Rodrigo R Catharino Edgard Graner Roger F Castilho Anibal E Vercesi
Suggested Reviewers:	Alison Colquhoun Universidade de São Paulo

	alison@usp.br Ellen S Pizer The Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, Maryland. epizer@jhmi.edu
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<p><b>Competing Interest</b></p> <p>For yourself and on behalf of all the authors of this manuscript, please declare below any competing interests as described in the <a href="#">"PLoS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests."</a></p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or competing interests.</p> <p>If no competing interests exist, enter: "The authors have declared that no competing interests exist."</p> <p>If you have competing interests to declare, please fill out the text box completing the following statement: "I have read the journal's policy and have the following conflicts"</p> <p>* typeset</p>	<p>The authors have declared that no competing interests exist.</p>
<p><b>Financial Disclosure</b></p> <p>Describe the sources of funding that have supported the work. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder's website. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders and amend the aforementioned sentence as needed.</p> <p>* typeset</p>	<p>This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 06/59786-0, 07/54639-1, 08/57471-7, and 11/50400-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 470539/2008-9).</p>
<b>Ethics Statement</b>	N/A.

All research involving human participants must have been approved by the authors' institutional review board or equivalent committee(s) and that board must be named by the authors in the manuscript. For research involving human participants, informed consent must have been obtained (or the reason for lack of consent explained, e.g. the data were analyzed anonymously) and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the [Declaration of Helsinki](#). Authors should submit a statement from their ethics committee or institutional review board indicating the approval of the research. We also encourage authors to submit a sample of a patient consent form and may require submission of completed forms on particular occasions.

All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, ["The use of non-human primates in research"](#) we specifically require authors to include details of animal welfare and steps taken to ameliorate suffering in all work involving non-human primates. The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.

Please enter your ethics statement below and place the same text at the beginning of the Methods section of your manuscript (with the subheading Ethics Statement). Enter "N/A" if you do not require an ethics statement.



Campinas (Brazil), January 17<sup>th</sup>, 2014.

Dear Editor,

Please find enclosed our manuscript entitled "Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non-tumorigenic melan-a cells associated with inhibition of mitochondrial respiration" by Franco A. Rossato, Karina G. Zecchin, Paolo G. La Guardia, Rose M. Ortega, Luciane C. Alberici, Rute A. P. Costa, Rodrigo R. Catharino, Edgard Graner, Roger F. Castilho, and Anibal E. Vercesi, which we would like to submit for publication in *PLoS ONE*.

This manuscript demonstrates that the FASN inhibitors cerulenin and orlistat induced apoptotic death in the non-tumorigenic cell line melan-a through a mechanism associated with the activation of the intrinsic apoptotic pathway, mitochondrial oxidative stress and respiratory chain impairment, independent of FASN inhibition. We believe this manuscript is especially suitable for publication in *PLoS ONE* because it involves at least three research areas: Biochemistry, Cancer and Pharmacology.

This work has neither been published (except in abstract or thesis form) nor is currently under consideration for publication by any other journal. All co-authors have read the manuscript and approved its submission.

Thank you for consideration.

Sincerely yours,

Anibal E. Vercesi, MD, PhD  
Professor of Clinical Pathology

## **Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non-tumorigenic melan-a cells associated with inhibition of mitochondrial respiration**

**Running title:** Non-tumorigenic melan-a cells and fatty acid synthase inhibitors

Franco A. Rossato<sup>1</sup>, Karina G. Zecchin<sup>1,2</sup>, Paolo G. La Guardia<sup>1</sup>, Rose M. Ortega<sup>2</sup>, Luciane C. Alberici<sup>3</sup>, Rute A. P. Costa<sup>1</sup>, Rodrigo R. Catharino<sup>1</sup>, Edgard Graner<sup>2</sup>, Roger F. Castilho<sup>1</sup>, and Anibal E. Vercesi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 13083-887, Brazil*

<sup>2</sup>*Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, 13414-018, Brazil*

<sup>3</sup>*Departamento de Química e Física, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, 14040-903, Brazil*

Correspondence: Dr. Anibal E Vercesi, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); Campinas, SP 13083-887, Brazil.

e-mail: [anibal@unicamp.br](mailto:anibal@unicamp.br)

**Abstract**

The metabolic enzyme fatty acid synthase (FASN) is responsible for the endogenous synthesis of palmitate, a saturated long-chain fatty acid. In contrast to most normal tissues, a variety of human cancers overexpress FASN. One such cancer is cutaneous melanoma, in which the level of FASN expression is associated with tumor invasion and poor prognosis. We previously reported that two FASN inhibitors, cerulenin and orlistat, induce apoptosis in B16-F10 mouse melanoma cells *via* the intrinsic apoptosis pathway. Here, we investigated the effects of these inhibitors on non-tumorigenic melan-a cells. Cerulenin and orlistat treatments were found to induce apoptosis and decrease cell proliferation, in addition to inducing the release of mitochondrial cytochrome c and activating caspases-9 and -3. Transfection with FASN siRNA did not result in apoptosis. Mass spectrometry analysis demonstrated that treatment with the FASN inhibitors did not alter either the mitochondrial free fatty acid content or composition. This result suggests that cerulenin- and orlistat-induced apoptosis events are independent of FASN inhibition. Analysis of the energy-linked functions of melan-a mitochondria demonstrated the inhibition of respiration, followed by a significant decrease in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and the stimulation of superoxide anion generation. The inhibition of NADH-linked substrate oxidation was approximately 40% and 61% for cerulenin and orlistat treatments, respectively, and the inhibition of succinate oxidation was approximately 46% and 52%, respectively. In contrast, no significant inhibition occurred when respiration was supported by the complex IV substrate *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD). The protection conferred by the free radical scavenger N-acetyl-cysteine indicates that the FASN inhibitors induced apoptosis through an oxidative stress-associated mechanism. In combination, the present results demonstrate that cerulenin and orlistat induce apoptosis in non-tumorigenic cells *via* mitochondrial dysfunction, independent of FASN inhibition.

**Key words:** cerulenin; fatty acid synthase; melan-a cells; orlistat; oxygen consumption.

## Introduction

The metabolic enzyme fatty acid synthase (FASN) is responsible for the production of saturated fatty acids, such as palmitate, through the condensation of acetyl-CoA and malonyl-CoA [1-7]. FASN products are used in the formation of cell membranes [8] and are responsible for a significant number of functions in the body, acting primarily as intracellular messengers and energy stores [9]. In most normal tissues, the expression and activity of FASN are low or absent; exceptions include instances where lipogenesis is necessary, such as in the liver, adipose tissue, breast tissue during lactation, endometrium during the proliferative phase and the lungs of newborns [2, 3, 10, 11]. In contrast, high FASN activity is found in several neoplasias that occur in breast, ovarian, prostate, thyroid, lung, stomach, pancreas, colon, esophagus, mouth and bladder tissues, as well as soft tissue sarcomas and melanoma [10, 12-33]. Further, increased FASN expression in malignant tumors is associated with a poor prognosis [4, 13, 14, 16, 17, 21, 24, 28, 29, 33-38].

FASN inhibition reduces cell proliferation and induces apoptosis *in vitro* and decreases the size of prostate, ovarian and breast cancer xenografts [39-41]. The biological mechanisms responsible for FASN inhibition-induced apoptosis remain unclear. The extrinsic apoptosis pathway, which is triggered by death domains, was described after siRNA silencing of FASN in breast cancer cells caused the accumulation of malonyl-CoA and ceramide [42, 43]. Mitochondrial involvement in apoptosis, as evidenced by increased levels of the pro-apoptotic protein Bax and the release of cytochrome c, has been found in several tumor cell lines, including neuroblastoma, melanoma, colon carcinoma, breast cancer and skin carcinoma, following pharmacological FASN inhibition [37, 44]. Despite the fact that the expression of a dominant-negative mutant p53 increased the sensitivity of colon carcinoma cells to FASN inhibitors [45], FASN inhibition-induced apoptosis was described as a p53-

independent process [44]. We recently showed that the inhibition of FASN activity with orlistat significantly impaired lipid synthesis, reduced proliferation and promoted apoptosis in the mouse metastatic melanoma cell line B16-F10 [46, 47]; additionally, similar treatment reduced experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas [48]. We showed that FASN inhibition activates the intrinsic apoptotic pathway, as evidenced by the release of cytochrome c and the activation of caspases-9 and -3; this activation is preceded by increased production of reactive oxygen species and elevated cytosolic calcium concentrations in these melanoma cells [47]. Orlistat treatment of B16-F10 cells also resulted in significant changes in the mitochondrial free fatty acid (FFA) composition, as demonstrated by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) [49].

Although several studies suggest that normal cells are more resistant to the cytotoxic action of FASN inhibitors [40, 43, 50-52], cerulenin and orlistat significantly reduced the proliferation of normal gingival fibroblasts and endothelial cells [26, 53, 54]. Here, we show that similar to B16-F10 cells, non-tumorigenic melan-a cells exhibit reduced proliferation and undergo apoptosis through the release of cytochrome c and the activation of caspases-9 and -3 when treated with FASN inhibitors. The effect of these FASN inhibitors on the non-tumorigenic cell line used here involves the inhibition of mitochondrial respiration but does not alter the FFA content of these cells.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell Culture and Reagents

Melan-a cells, the first known line of non-tumorigenic mouse melanocytes and a normal counterpart to melanoma cells [55], were obtained from Profª. Miriam Galvonas Jasiulionis (Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil) and were cultured in RPMI-1640 medium (Vitrocell, Brazil) supplemented with 5% fetal bovine serum (Vitrocell), 200 nM 12-*o*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 mg/ml gentamycin (Vitrocell), 100 IU/ml penicillin (Vitrocell) and 100 mg/ml streptomycin (Vitrocell) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. To block FASN activity, either cerulenin (Sigma-Aldrich, USA) or orlistat (Roche, Switzerland) was added to the culture medium at the concentration specified in the figure legends. Orlistat was extracted from Xenical capsules as previously described [56]. The equivalent concentrations of cerulenin and orlistat solvents, 0.025% DMSO and 0.012% ethanol (EtOH), respectively, were present under control conditions.

The non-tumorigenic HaCaT cell line, which was derived from human keratinocytes, was purchased from Cell Line Service (CLS, Heidelberg, Germany). HaCaT cells were grown in a high-glucose DMEM culture medium (Vitrocell) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics, in the same manner as that described for the melan-a cells.

### Determination of Cell Viability and Proliferation

To determine the antiproliferative and cytotoxic effects of cerulenin and orlistat, the cells were stained with 0.1% trypan blue and then counted in a Neubauer chamber, as previously described [47]. Cell viability was determined by excluding the stained cells, as well as by using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT, Sigma). Briefly, melan-a cells were plated in 6-well culture plates (2.5-

6.5x10<sup>4</sup> cells per well), and after 24 h, the medium was replaced with fresh medium that contained the FASN inhibitors. After an additional 24 or 48 h, the cells were incubated with 2.5 mg/ml MTT for 4 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Then, the medium was removed, and 1 ml of absolute ethanol was added to each well for complete solubilization of the generated formazan. The contents were subsequently transferred to 96-well plates, and the absorbance was determined at 540 nm with the aid of a microplate reader (Bio-Rad, USA). In this work, cell viability is expressed as the percentage of viable cells relative to the controls.

#### Analysis of Cell Death and Cell Cycle

The samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) equipped with an argon laser and Cell-Quest software (version 4.1). Between seven and ten thousand events were acquired per sample. Melan-a populations were identified based on their light-scattering characteristics by enclosing the samples in electronic gates and analyzing for the intensity of the fluorescent probe signal.

For the cell death analysis, melan-a cells (10<sup>5</sup>) were washed with PBS and resuspended in binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>) containing annexin V-FITC (1:500, Invitrogen, USA) and 7-AAD (20 mg/ml, 7-amino-actinomycin D, Molecular Probes, USA), as previously described [47]. Cell apoptosis was quantified by flow cytometry as the number of annexin V-FITC-positive and 7-AAD-negative cells, and necrosis was quantified as the number of 7-AAD-positive and annexin V-FITC-negative cells, both divided by the total number of cells.

Cell cycle analyses were performed as previously described [46, 47]. Melan-a cells were seeded in 6-well culture plates (2.5–6.5x10<sup>4</sup> cells). After 24 h, the medium was replaced with serum-free medium, and the cells were incubated for an additional

24 h. The medium was replaced with fresh medium containing serum and the respective FASN inhibitor, and the cells were incubated for an additional 24 or 48 h, then harvested and fixed in cold 70% ethanol. The cells were then washed in PBS, treated with 10 µg/ml RNase for 1 h at 37°C and stained with 50 µg/ml propidium iodide (Sigma) for 2 h at 41°C. The distribution of cells in the cell cycle was analyzed by flow cytometry. The cell cycle phases were analyzed using ModFit LT™ (Verity Software House, USA).

#### **Measurement of ROS**

Following treatment with cerulenin or orlistat for 24 or 48 h, the cells were incubated with 5 µM MitoSOX (Molecular Probes) at 37°C for 10 min to detect mitochondrial superoxide production [57]. The ROS levels were analyzed by flow cytometry, as previously described [47, 58].

#### **Detection of Caspase-3 Activation**

Caspase-3 activation was assessed by incubating  $10^6$  cells with FITC-DEVD-FMK (1:300, Calbiochem, USA) in serum-free medium for 40 min at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After a wash step was performed according to the manufacturer's instructions, the cells were resuspended in the same medium and analyzed by flow cytometry, as previously described [46].

#### **Detection of Caspases-9 and -8 Activities**

Cells ( $3 \times 10^6$  cells) were resuspended in 0.2 ml of chilled lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM KCl, 250 mM sucrose, 2 mM MgCl and 1 mM EDTA) containing 0.5 mM DTT. The cell suspensions were sonicated (Mostonix Sonicator S-3000, New Highway Farmingdale, USA) and frozen at -80°C. The cell lysates were thawed and centrifuged at 15,000 g for 30 min, and the supernatants were added to 0.2 ml of

reaction buffer (25 mM HEPES pH 7.5, 10% sucrose and 0.1% CHAPS) containing 10 mM DTT. The reactions were initiated by the addition of the caspase-8 or -9 substrates, 0.1 mM Ac-LETD-AFC (Sigma) or 0.2 mM LEHD-pnitroanilide (Calbiochem), respectively, and were incubated for 1.5 h at 37°C, as previously described [47]. Caspase-8 activity was determined by measuring the fluorescence of free AFC using a Hitachi F4500 spectrofluorometer (Hitachi High-Tech, Japan), with excitation and emission wavelengths of 400 and 505 nm, respectively, and slit widths of 5.0 nm. Melan-a cells treated for 20 h with 1.25 µg/ml cycloheximide (Sigma) and 10 nM tumor necrosis factor alpha (TNFα, Peprotech, USA) were used as positive controls. Caspase-9 activity was determined by measuring the absorbance of free p-nitroanilide using a Varian Cary 50 spectrophotometer (Biocompare, USA) at 405 nm.

#### Detection of Cytochrome c Release

After the cells were treated with cerulenin or orlistat for 12 or 24 h, the release of mitochondrial cytochrome c was detected by flow cytometry [59]. Briefly, 10<sup>6</sup> cells were washed with PBS, resuspended in 1 ml of mitochondrial medium (125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES buffer pH 7.2, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) supplemented with 1% mix of protease inhibitors and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and then permeabilized with 0.0001% digitonin. Pellets were resuspended in 0.5 ml of 4% paraformaldehyde in PBS and incubated for 20 min at room temperature. After two washes with PBS, the cells were incubated in 0.5 ml of labeling medium (2% fetal bovine serum, 0.2% sodium azide and 0.5% Triton X-100 in PBS) for 15 min, centrifuged at 3,000 g for 5 min and then incubated with an anti-cytochrome c antibody (1:500, 6 H2.B4, Promega, USA) at 4°C for 1 h. The cells were then washed twice in the same medium and incubated with an anti-mouse-FITC antibody (1:200, Vector Laboratories, USA) at 4°C for 1 h. The cells were washed once

more as described above, resuspended in PBS and analyzed by flow cytometry as described elsewhere [59].

#### Assessment of Mitochondrial Membrane Potential ( $\Delta\Psi_m$ )

The  $\Delta\Psi_m$  in the digitonin-permeabilized melan-a cells was estimated by changes in Safranin O fluorescence [60], as recorded using a spectrofluorometer (Hitachi, model F-4500, Tokyo, Japan) operated at excitation and emission wavelengths of 495 and 586 nm, respectively, with slits widths of 5 nm. Melan-a cells were treated with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cerulenin for 24 h or with 30  $\mu\text{M}$  orlistat for 48 h. Approximately  $2 \times 10^6$  viable cells were permeabilized with 15  $\mu\text{M}$  digitonin in 2 ml of reaction medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 65 mM Tris-HCl (pH 7.2), 2.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50  $\mu\text{M}$  EGTA, 5 mM succinate, 0.01% BSA and 5  $\mu\text{M}$  Safranin O; then, the reactions were incubated at 37°C while stirring [58, 61-63].

#### Cellular Respiration

Following either 24 h of treatment with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cerulenin or 48 h of treatment with 30  $\mu\text{M}$  orlistat, the consumption of oxygen by the melan-a cells was measured using a closed-chamber high-resolution respirometry Oroboros (Innsbruck, Austria) equipped with a magnetic stirrer and temperature control set at 37°C [64-66]. Approximately  $2 \times 10^6$  viable cells were added to 2 ml of reaction medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 2.0 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.0 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7.2), 50  $\mu\text{M}$  EGTA, 0.01% BSA and NADH-linked substrates (2.0 mM malate, 1.0 mM  $\alpha$ -ketoglutarate, 1.0 mM pyruvate and 1.0 mM glutamate). Then, the melan-a cells were permeabilized by the addition of 15  $\mu\text{M}$  digitonin, and the oxidative phosphorylation and mitochondrial respiratory activity were analyzed by the sequential addition of 300  $\mu\text{M}$  ADP, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  oligomycin, 100 nM carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

(FCCP), 5 mM succinate, 0.5  $\mu$ M antimycin and 200  $\mu$ M N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) with 2 mM ascorbate. The data were determined using the device software.

#### Citrate Synthase Activity

Citrate synthase activity in the cell suspension was analyzed by spectrophotometry based on the conversion of oxaloacetate and acetyl-CoA to citrate and SH-CoA. This reaction is catalyzed by citrate synthase and was monitored by measuring the colorimetric product thionitrobenzoic acid [47]. Cytosolic fractions were incubated at 37°C in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% Triton X-100, 250  $\mu$ M oxaloacetate, 50  $\mu$ M acetyl-CoA, and 100  $\mu$ M 5,50-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). The increase in absorbance at 412 nm was recorded over 6 min.

#### RNA Interference (RNAi)-Mediated Silencing of FASN Expression

Twenty-five-mer RNA molecules were chemically synthesized, annealed and purified by the manufacturer (Stealth RNAi, Invitrogen). Three sequences targeting *Mus musculus* FASN (NM\_00798) were used, corresponding to nucleotides 940–964 (50-CAATGATGGCCAACGGCTCTCTTT-30), 3406–3432 (50-TGGGAAGACCCGAAGTCAAGTTAT-30) and 5841–5865 (50-CCTCTGGGCATGGCTATCTTCTTGA-30), as previously described [46]. Melan-a cells grown to 50% confluence were transfected with 200 nM of a mixture containing equal parts of the FASN siRNAs using a liposome method according to the manufacturer's instructions (Lipofectamine 2000, 2  $\mu$ g/ml, Invitrogen). Negative control cells were transfected with equimolar concentrations of a nonspecific control oligo (Stealth RNAi Negative Control Duplexes, Medium GC Duplex, Invitrogen). Transfections were performed in 35-mm<sup>2</sup> dishes, and after 48 h, the cells were collected to assess FASN knockdown and to detect cell death. FASN knockdown was confirmed by Western blot

analysis using approximately 40 µg of the protein lysates and antibodies against FASN (BD Biosciences, 1:3000) or beta-actin (AC-15, Sigma, 1:40 000) as a loading control. The reactions were developed with an enhanced chemiluminescence detection system (ECL detection kit, Amersham Pharmacia Biotech, USA) according to the manufacturer's instructions.

### **Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)**

ESI-MS was used to analyze the melan-a mitochondria, as previously described [49], with few modifications. After the mitochondria were extracted, the total protein content was quantified using the Bradford method. Lipid extraction was performed as described by Bligh and Dyer (1959) [67]. The mitochondria-containing pellets were resuspended in 0.1 ml of ultrapure H<sub>2</sub>O, and 0.5 ml of a solution of methanol/toluene (7:3 v/v) and 0.05 ml of a methanol solution of ammonia (0.1% v/v) were added to each sample. This diluted solution was then directly infused according to the following protocol. A total of 16 samples was analyzed, 4 from the control and 4 from the treated cells for each FASN inhibitor.

Lipid analyses were performed in negative mode using an ESI Q-TOF Premier (Waters) coupled with a nanoelectrospray source introduced via direct injection, performed at a flow rate of 10 µL/min and using a Harvard Apparatus pump. The nanoelectrospray voltage was set to 2.5 kV; the cone voltage, to 40 V; the source temperature, to 120°C; the desolvation temperature, to 200°C; and the collision energy, to 10 V. The instrument was operated in MS continuum mode, and data were acquired from m/z 50–1,000 with a scan rate of 1 s and an interscan delay of 0.1 s. The data were analyzed using the Masslynx 4.1 software package. The spectra were accumulated over 6 s in the region with flow rate stability. The spectra were smoothed (2 × 3 channels, Savitzky Golay smooth), and the mass centroid values were obtained using 80% of the peak top and the minimum peak width at half-height of 4 channels.

Principal component analysis was performed using the MetaboAnalyst software. Data were autoscaled for principal component analysis (PCA) and partial least square discriminant analysis (PLS-DA). The analyses were performed using the MetaboAnalyst online platform [68, 69], supported by the use of the Pirouette (v. 4.0, Infometrix, Inc.) software.

#### **Statistical Analysis**

The results from at least three independent experiments, each performed in duplicate or triplicate, are displayed as the mean  $\pm$  s.e.m. Comparisons between the groups were performed using One-Way Analysis of Variance with Tukey's post-hoc analysis. The level of significance was set at  $p < 0.05$ . All data were analyzed using SigmaStat software, version 3.5 (Systat Software, USA).

## Results

### FASN inhibitors decrease melan-a cell viability and proliferation and induce cell death in a dose-dependent manner

The viability of melan-a cells was significantly reduced after treatment with cerulenin or orlistat (Figure 1). Death in the melan-a cell line occurred mainly by apoptosis, as we previously demonstrated for the B16-F10 melanoma cells [47], while the necrosis rates remained unchanged by these treatments (data not shown).

Cell cycle analysis was performed to verify the effects of both FASN inhibitors on cell proliferation. After 24 h of serum starvation, approximately 80% of the melan-a cells were in the G0/G1 phase (data not shown). The cerulenin- and orlistat-treated melan-a cells demonstrated reductions of 25% and 42% in S phase, respectively, when compared to the controls (Figure 2 A). Cell cycle arrest was confirmed by increased levels of the p21<sup>WAF1/Cip1</sup> tumor suppressor protein, as shown by Western blot analysis (Figure 2 B). The treatment of melan-a cells with cerulenin and orlistat increased p21<sup>WAF1/Cip1</sup> levels by 1.4- and 3.4-fold, respectively, compared to the control cells.

The FASN inhibitors were also tested in another non-tumorigenic cell line, HaCaT, which is derived from normal keratinocytes. Similar to the melan-a cells, cerulenin and orlistat reduced the viability and proliferation of HaCaT and induced apoptosis (Supplemental Figure 1). The HaCaT cells were more resistant to apoptosis than the melan-a cells, especially when treated with cerulenin. The HaCaT cells also showed lower levels of FASN protein when compared to the melan-a cells, as verified by Western blot analysis (Supplemental Figure 2). Cell cycle analysis of the HaCaT cells after treatment with the FASN inhibitors revealed a significant degree of cell cycle arrest. Cerulenin and orlistat treatment increased the number of cells in G0/G1 phase by 3- and 6-fold, respectively (Supplemental Figure 3 A). Treatment with the FASN

Inhibitors also increased the p21<sup>WAF1/Cip1</sup> protein content by 1.3- or 35-fold when compared to the respective controls (Supplemental Figure 3 B).

### **Mitochondrial dysfunction participates in melan-a cell death induced by FASN inhibitors**

Recently, we demonstrated the release of mitochondrial cytochrome c in the FASN inhibition-induced apoptosis of B16-F10 melanoma tumor cells [47]. Because FASN inhibitors also induced apoptosis in the melan-a cells (Figures 1 E and F), the non-tumorigenic melanoma cell counterpart [55], the percentage of cytochrome c released was also determined in these cells. Cerulenin and orlistat treatment for 12 and 24 h culminated in the release of cytochrome c in the melan-a cells (16% and 12%, respectively) (Figure 3 A), and this finding was accompanied by the activation of caspase-3 (52% and 24%, respectively) (Figure 3 B) and caspase-9 (28% and 24%, respectively) (Figure 3 C). No significant differences were found in caspase-8 activity (Figure 3 D). Pre-treatment with cyclosporin A, which is a classic inhibitor of mitochondrial permeability transition, did not protect the melan-a cells from cerulenin- or orlistat-induced apoptosis (Supplemental Figure 4 A). Apoptosis in the melan-a cells was also shown to be independent of p53 activation, as pre-treatment with pifithrin- $\alpha$  (PFT), which is a known synthetic inhibitor of p53 [70], did not prevent FASN inhibitor-induced cell death (Supplemental Figure 4 B).

*In situ* analysis of the energy-linked functions of melan-a mitochondria indicated that treatment with the FASN inhibitors decreased the  $\Delta\Psi_m$  and inhibited respiration (Figures 4 and 5). Digitonin-permeabilized melan-a cells showed the ability to phosphorylate ADP, as illustrated by the carboxyatractyloside (CAT) sensitive decrease in  $\Delta\Psi_m$  (Figure 4, panels A and B, black lines), while both the cerulenin and orlistat treatments (Figure 4, panels A and B, green lines) resulted in significant decreases in  $\Delta\Psi_m$  and the inability of the mitochondria to respond to the addition of ADP and CAT.

To gain a better understanding of the possible mechanism involved in mitochondrial dysfunction, we analyzed the mitochondrial generation of superoxide in the melan-a cells. Figure 4 C shows a significant increase in the production of mitochondrial superoxide when the cells were incubated with either FASN inhibitor. Because mitochondria can be both an important source and target of ROS [71], we then analyzed the possible mitochondrial dysfunctions caused by ROS attack. Therefore, the nature of the  $\Delta\Psi_m$  decrease by FASN inhibitors was assessed by measuring mitochondrial respiration under both uncoupled or phosphorylating conditions using NADH-linked substrates, succinate or the complex IV substrate TMPD (Figure 5). The results presented in panels A and B show that both cerulenin and orlistat resulted in a significant inhibition of NADH-linked substrate-supported respiration. As expected, the extent of the respiration inhibition was more significant at the maximum rates (FCCP present). Panels C and D show the rates of uncoupled succinate or TMPD-supported respiration, which indicate a significant inhibition of succinate but not of TMPD oxidation. Panel E provides evidence that the FASN inhibitors did not alter the number or mass of mitochondria, as indicated by the lack of an observable effect on citrate synthase activity. Therefore, our results show that the FASN inhibitors activate apoptosis in melan-a cells through a mechanism that involves the inhibition of mitochondrial respiration.

To determine whether FASN inhibitor-induced cell death can be prevented by ROS scavenging agents, further experiments were conducted in the presence of N-acetyl cysteine (NAC). NAC produces important metabolic products that control the cellular redox state, protect cells against mitochondrial dysfunctions associated with oxidative stress, and act as ROS scavengers [72-75]. Melan-a cells were then incubated with 5 mM NAC for 1 h prior to cerulenin or orlistat treatment. The results show that the melan-a cell death induced by cerulenin and orlistat were inhibited by 87% and 47%, respectively, in the presence of NAC (Figure 6, A and B).

### Ceruleinin- and orlistat-induced apoptosis events in melan-a type cells occur independently of FASN inhibition

To determine whether the effects of ceruleinin and orlistat on cell viability, proliferation and mitochondrial function were related to the actions of the respective agents on FASN, the enzymatic activity of FASN was evaluated. Despite the detection of FASN protein by Western blot analysis (Supplemental Figure 2), the enzymatic activity of FASN in melan-a cells was too low for quantification using radioactive markers with higher sensitivity, such as [<sup>3</sup>H]-water and [<sup>14</sup>C]-acetate (data not shown), as was previously performed for B16-F10 melanoma cells [46]. These results were supported by RNAi experiments that successfully down-regulated FASN expression in melan-a cells by significantly reducing protein levels (Figure 7 A) without a corresponding increase in apoptotic rates (Figure 7 B).

ESI-MS was performed in melan-a cells to analyze the mitochondrial FFA composition after treatment with the FASN inhibitors. In contrast to what we observed in the melanoma B16-F10 cells [49], the incubation of the non-tumorigenic cells with ceruleinin or orlistat did not significantly alter the FFA content when principal component analysis (PCA) was applied to the ESI-MS data. The relative concentration (%) of palmitic acid was not significantly modified after treatment with the FASN inhibitors (DMSO and ceruleinin: 38.6 and 43.4%, respectively; EtOH and orlistat: 41.6 and 39.0%, respectively). Additionally, non-significant alterations were observed for the most abundant FFAs detected, which include myristic acid (DMSO and ceruleinin: 15.0 and 10.2%, ethanol and orlistat: 20.1 and 24.4%, respectively) and stearic acid (DMSO and ceruleinin: 26.6 and 31.8%, EtOH and orlistat: 22.1 and 14.5%, respectively). Together, the ESI-MS and RNAi results suggest that the effects of ceruleinin and orlistat on melan-a proliferation and viability are independent of their effects on FASN levels and activity.

## Discussion

FASN has been described as a possible target for chemotherapy because its expression is low or absent in most normal tissues and, in contrast, is high in a significant variety of human malignant tumors, where FASN plays important roles in proliferation [10, 12, 13, 16, 18-20, 22-25, 27, 28, 30-32]. As a result, FASN inhibitors are potential antitumor agents due to their ability to reduce cell proliferation and induce apoptosis [44, 47, 56, 76] without apparent toxicity to normal tissues [50, 51]. Although the role of FASN in nonmalignant cells remains uncertain, it is known that the FASN inhibitor cerulenin promotes a reduction in the proliferation of normal fibroblasts in primary cultures [52, 53], and orlistat has been shown to have antiproliferative effects in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) [26, 48, 54].

Here, we analyzed the mechanisms of toxicity of the FASN inhibitors cerulenin and orlistat in cells derived from non-tumorigenic mouse melanoblasts. When these melan-a cells were incubated with FASN inhibitors, the cells underwent apoptosis and exhibited a reduced proliferative rate (Figure 1), an increased percentage of cells in G0/G1 phase (Figure 2 A) and an increased level of p21<sup>WAF1/Cip1</sup> tumor suppressor protein (Figure 2 B). We also evaluated the effects of the FASN inhibitors on non-tumorigenic HaCaT cells. Although these cells were more resistant to apoptosis than the melan-a cells, the HaCaT cells underwent a significant cell cycle arrest (Supplemental Figures 1 and 3). These results are in agreement with data showing that FASN inhibitors promote cell death and cell cycle arrest, along with the increased expression of both p21<sup>WAF1/Cip1</sup> and p53 in colon, breast, gastrointestinal and human melanoma tumor cells [45, 76-78].

The increased number of annexin V-positive melan-a cells (Figure 1 E and F), the release of cytochrome c (Figure 4 A) and the activation of caspases-9 and -3 (Figure 4 B and C) are compatible with the activation of the intrinsic apoptosis pathway [79-81]. Similar results have been obtained with neuroblastoma, breast cancer

and melanoma cell lines [37, 44, 47]. This interpretation is also supported by the lack of caspase-8 activation by the FASN inhibitors, a result that excludes the extrinsic apoptosis pathway in melan-a cell death [82]. In agreement with our results, the exclusion of the extrinsic apoptosis pathway was previously reported for breast tumor cells after FASN inhibition [42]. Additionally, the present data indicate that the FASN inhibitor-induced apoptosis was independent of the activation of p53 in the melan-a cells because pre-treatment with pifithrin-alpha (PFT) [70] did not prevent cell death (Supplemental Figure 4 B). These data are supported by other results, indicating that p53 did not participate in cerulenin-induced cell death in neuroblastoma, melanoma, colon carcinoma, breast cancer, skin carcinoma and glioma tumor cells [44, 47, 56, 78]. Accordingly, cerulenin toxicity was higher in p53 knockout cells than in control RKO colon carcinoma cells [45].

To further investigate the role of FASN activity in nonmalignant cells, we successfully down-regulated FASN expression in melan-a cells using RNAi (Figure 7 A) and showed that the apoptosis rate remained unchanged (Figure 7 B). Additionally, using the ESI-MS technique, we also demonstrated that the mitochondrial FFA content and composition did not change. Taken together, the RNAi and ESI-MS results suggest that the FASN inhibitors act on melan-a cell mitochondria independently of the changes in FASN activity.

To uncover the link between mitochondrial dysfunction and apoptosis in melan-a cells treated with the FASN inhibitors, we analyzed the mitochondrial energy-linked functions in these cells. Both cerulenin and orlistat were able to independently inhibit the rates of NADH-linked and succinate-supported respiration. This result was followed by both a decrease in  $\Delta\Psi_m$  (Figure 4 A and B) and a significant increase in superoxide production (Figure 4 C). In agreement with these results, it was previously reported that silencing the ACC- $\alpha$  (acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$ ) and FASN genes resulted in increased ROS production and mitochondrial dysfunction [83].

The lack of change in both the rate of respiration supported by the complex IV substrate TMPD (Figure 5 E) and the activity of citrate synthase provides evidence that treatment with the FASN inhibitors did not alter either the number of mitochondria or the mitochondrial mass (Figure 5 F). Therefore, we hypothesize that the decreased respiration rates are the consequence of damage to respiratory complexes I and II. It is well known that the inhibition of these respiratory complexes by various metabolic inhibitors, including statins [65, 84], is mediated by superoxide anion attack on the 4Fe-4S clusters [85]. The results indicating that NAC pre-incubation prior to treatment with FASN inhibitors significantly protected the melan-a cells from apoptosis (Figure 6 A and B) support the interpretation that the mitochondrial dysfunction observed here is the consequence of superoxide attack to respiratory complexes I and II. Additionally, it has been reported that cell death via the activation of the intrinsic apoptosis pathway can further stimulate ROS production and disrupt respiratory chain complexes I and II through caspase 3, as discussed below.

During apoptosis, the mitochondrial outer membrane becomes permeable to pro-apoptotic proteins, such as cytochrome c, which lead to the formation of apoptosome complexes through the interaction of caspase-9 and APAF-1 [86]. The activation of downstream caspase-3 results in the cleavage of specific substrates that induce DNA fragmentation, nuclear condensation, phosphatidylserine externalization and membrane blebbing [87-91]. Further, caspase-3 activation inhibits respiration at the levels of complexes I and II [92]. NADH dehydrogenase Fe-S protein 1 (NDUFS1 or p75), which is the largest subunit of complex I, serves as a substrate for the activity of caspase-3 during apoptosis. Cleavage by p75 directly inhibits the function of complex I, leading to  $\Delta\psi_m$  collapse, ROS generation and mitochondria damage [93].

In conclusion, the present results indicate that the FASN inhibitors cerulenin and orlistat induced apoptotic death in the non-tumorigenic cell line melan-a through a mechanism associated with the activation of the intrinsic apoptotic pathway.

mitochondrial oxidative stress and respiratory chain impairment, independent of FASN inhibition.

**Acknowledgments:** We acknowledge the Mass Spectrometry Laboratory at Brazilian Biosciences National Laboratory, CNPEM, Campinas, Brazil for their support with the mass spectrometry analysis.

## References

1. Baron A, Migita T, Tang D and Loda M (2004) Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *Journal of cellular biochemistry* 91: 47-53.
2. Chirala SS, Jayakumar A, Gu ZW and Wakil SJ (2001) Human fatty acid synthase: role of Interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 3104-3108.
3. Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, et al. (2000) Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3450-3454.
4. Menendez JA and Lupu R (2007) Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature reviews* 7: 763-777.
5. Rangan VS, Joshi AK and Smith S (2001) Mapping the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation in vitro. *Biochemistry* 40: 10792-10799.
6. Stoops JK and Wakil SJ (1981) Animal fatty acid synthetase. A novel arrangement of the beta-ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *The Journal of biological chemistry* 256: 5128-5133.
7. Tsukamoto Y, Wong H, Mattick JS and Wakil SJ (1983) The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. *The Journal of biological chemistry* 258: 15312-15322.
8. Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, et al. (2003) Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null

mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6358-6363.

9. Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP and Chinnaiyan AM (2003) Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer research* 63: 132-139.
10. Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K and Suzuki T (2002) Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology* 40: 71-79.
11. Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, et al. (1986) Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 367: 905-912.
12. Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, et al. (2004) Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral oncology* 40: 728-735.
13. Aio PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, et al. (2000) Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncology reports* 7: 1383-1388.
14. da Silva SD, Cunha IW, Nishimoto IN, Soares FA, Carraro DM, et al. (2009) Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Oral oncology* 45: e134-139.

15. Dowling S, Cox J and Cenedella RJ (2009) Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. *Lipids* 44: 489-498.
16. Innocenzi D, Ajo PL, Balzani A, Sebastiani V, Sillipo V, et al. (2003) Fatty acid synthase expression in melanoma. *Journal of cutaneous pathology* 30: 23-26.
17. Kapur P, Rakheja D, Roy LC and Hoang MP (2005) Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. *Mod Pathol* 18: 1107-1112.
18. Krontras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, et al. (1999) Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head & neck* 21: 325-329.
19. Milgram LZ, Witters LA, Pasternack GR and Kujawa FP (1997) Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 3: 2115-2120.
20. Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, et al. (2001) Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology* 69: 297-303.
21. Ogino S, Nosho K, Meyerhardt JA, Kirkner GJ, Chan AT, et al. (2008) Cohort study of fatty acid synthase expression and patient survival in colon cancer. *J Clin Oncol* 26: 5713-5720.
22. Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, et al. (2000) The expression of fatty acid synthase (FAS) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Human pathology* 31: 1066-1073.

23. Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA and Han WF (1998) Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer research* 58: 4611-4615.
24. Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Del Tos AP, et al. (2006) Gastrointestinal stromal tumours overexpress fatty acid synthase. *The Journal of pathology* 209: 369-375.
25. Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, et al. (2004) Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral oncology* 40: 688-696.
26. Silva SD, Cunha IW, Rangel AL, Jorge J, Zecchin KG, et al. (2008) Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. *Virchows Arch* 453: 57-67.
27. Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, et al. (2002) Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *International journal of cancer* 98: 19-22.
28. Takahiro T, Shinichi K and Toshimitsu S (2003) Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 9: 2204-2212.
29. Ueda SM, Yap KL, Davidson B, Tian Y, Murthy V, et al. (2010) Expression of Fatty Acid Synthase Depends on NAC1 and Is Associated with Recurrent Ovarian Serous Carcinomas. *J Oncol* 2010: 285191.
30. Visca P, Aio PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, et al. (1999) Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas,

- carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res* 5: 4111-4116.
31. Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, et al. (2003) Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer research* 23: 335-339.
32. Vlad LD, Axlottis CA, Merino MJ and Green W (1999) Fatty Acid Synthase Is Highly Expressed in Aggressive Thyroid Tumors. *Mod Pathol* 12: 70.
33. Walter K, Hong SM, Nyhan S, Canto M, Fedarko N, et al. (2009) Serum fatty acid synthase as a marker of pancreatic neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 2380-2385.
34. Epstein JI, Carmichael M and Partin AW (1995) OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 45: 81-86.
35. Gansler TS, Hardman W, 3rd, Hunt DA, Schaffel S and Hennigar RA (1997) Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Human pathology* 28: 686-692.
36. Kuhajda FP (2000) Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif 16: 202-208.
37. Liu X, Shi Y, Giranda VL and Luo Y (2006) Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA-MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis. *Molecular cancer therapeutics* 5: 494-501.

38. Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, et al. (2003) Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res* 1: 707-715.
39. Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N and Smith JW (2004) Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer research* 64: 2070-2075.
40. Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, et al. (1996) Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer research* 56: 2745-2747.
41. Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, et al. (1996) Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer research* 56: 1189-1193.
42. Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SK, Hirota S, et al. (2006) Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer research* 66: 5934-5940.
43. Zhang JH, Zhang Y and Herman B (2003) Caspases, apoptosis and aging. *Ageing research reviews* 2: 357-366.
44. Helligtag SJ, Bredehorst R and David KA (2002) Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. *Cell death and differentiation* 9: 1017-1025.
45. Li JN, Gorospe M, Chrest FJ, Kumaravel TS, Evans MK, et al. (2001) Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer research* 61: 1493-1499.

46. Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, et al. (2008) Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *International journal of cancer* 123: 2557-2565.
47. Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, Melo DR, Alberici LC, et al. (2010) Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. *Lab Invest* 91: 232-240.
48. Seguin F, Carvalho MA, Bastos DC, Agostini M, Zecchin KG, et al. (2012) The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. *British journal of cancer* 107: 977-987.
49. Zecchin KG, Alberici LC, Riccio MF, Eberlin MN, Vercesi AE, et al. (2011) Visualizing inhibition of fatty acid synthase through mass spectrometric analysis of mitochondria from melanoma cells. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25: 449-452.
50. Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS, et al. (2000) Increase fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen independent prostate cancer progression. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 41: 655.
51. Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, et al. (2000) Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer research* 60: 213-218.
52. Deepa PR, Vandhana S, Jayanthi U and Krishnakumar S (2012) Therapeutic and toxicologic evaluation of anti-lipogenic agents in cancer cells compared with non-neoplastic cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110: 494-503.

53. Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, et al. (2005) Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *Journal of periodontology* 76: 272-278.
54. Browne CD, Hindmarsh EJ and Smith JW (2005) Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *Faseb J* 20: 2027-2035.
55. Bennett DC, Cooper PJ and Hart IR (1987) A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *International journal of cancer* 39: 414-418.
56. Knowles LM, Axeirod F, Browne CD and Smith JW (2004) A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *The Journal of biological chemistry* 279: 30540-30545.
57. Payne CM, Weber C, Crowley-Skillicorn C, Dvorak K, Bernstein H, et al. (2007) Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis* 28: 215-222.
58. Zecchin KG, Seidinger AL, Chiaratti MR, Degasperi GR, Melrelles FV, et al. (2007) High Bcl-2/Bax ratio in Walker tumor cells protects mitochondria but does not prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via calcineurin pathways. *J Bioenerg Biomembr* 39: 186-194.
59. Campos CB, Palm BA, Cosso RG, Castilho RF, Rottenberg H, et al. (2006) Method for monitoring of mitochondrial cytochrome c release during cell death: Immunodetection of cytochrome c by flow cytometry after selective permeabilization of the plasma membrane. *Cytometry A* 69: 515-523.

60. Holden MJ and Sze H (1989) Effects of *Helminthosporium maydis* Race T Toxin on Electron Transport in Susceptible Corn Mitochondria and Prevention of Toxin Actions by Dicyclohexylcarbodiimide. *Plant Physiol* 91: 1296-1302.
61. Campos CB, Degasperl GR, Pacifico DS, Alberici LC, Carneira RS, et al. (2004) Ibuprofen-induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome c release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition. *Biochemical pharmacology* 68: 2197-2206.
62. Figueira TR, Melo DR, Vercesi AE and Castilho RF (2012) Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol Biol* 810: 103-117.
63. Vercesi AE, Bernardes CF, Hoffmann ME, Gadelha FR and Docampo R (1991) Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *The Journal of biological chemistry* 266: 14431-14434.
64. Oliveira KA, Zecchin KG, Alberici LC, Castilho RF and Vercesi AE (2008) Simvastatin inducing PC3 prostate cancer cell necrosis mediated by calcineurin and mitochondrial dysfunction. *J Bioenerg Biomembr* 40: 307-314.
65. Silvent P, Bordenave S, Vermaelen M, Roels B, Vassort G, et al. (2005) Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1426-1434.
66. Vercesi AE, Rodrigues CO, Ujemura SA, Zhong L and Moreno SN (1998) Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry* 273: 31040-31047.

67. Bligh EG and Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37: 911-917.
68. Xia J, Mandal R, Sineelnikov IV, Broadhurst D and Wishart DG (2009) MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res* 40: W127-133.
69. Xia J, Psychogios N, Young N and Wishart DG (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res* 37: W652-660.
70. Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, et al. (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science (New York, NY)* 285: 1733-1737.
71. Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, et al. (2013) Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid Redox Signal* 18: 2029-2074.
72. Anuoma OI, Halliwell B, Hoey BM and Butler J (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free radical biology & medicine* 6: 593-597.
73. Balkova P, Hlavackova M, Millerova M, Neckar J, Kolar F, et al. (2011) N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiol Res* 60: 467-474.
74. Mayer M and Noble M (1994) N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7496-7500.

75. Meister A and Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.
76. Menendez JA, Vellon L and Lupu R (2005) Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol* 16: 1253-1267.
77. Ho TS, Ho YP, Wong WY, Chi-Ming Chiu L, Wong YS, et al. (2007) Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother* 61: 578-587.
78. Menendez JA, Vellon L and Lupu R (2005) Orlistat: from antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB-2)-overexpressing gastrointestinal tumors? *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ 230: 151-154.
79. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
80. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157.
81. Zou H, Li Y, Liu X and Wang X (1999) An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry* 274: 11549-11556.
82. Wu CC and Bratton SB (2013) Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 19: 546-558.

83. Chajes V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM and Joulin V (2006) Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer research* 66: 5287-5294.
84. La Guardia PG, Alberici LC, Ravagnani FG, Catharino RR and Vercesi AE (2013) Protection of rat skeletal muscle fibers by either L-carnitine or coenzyme Q10 against statins toxicity mediated by mitochondrial reactive oxygen generation. *Front Physiol* 4: 103.
85. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Taylor G, Sherer T, et al. (2005) Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *The Journal of biological chemistry* 280: 42026-42035.
86. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, et al. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex Initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
87. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, et al. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3: 339-345.
88. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, et al. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.
89. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, et al. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science (New York, NY)* 278: 294-298.

90. Rudel T, Zenke FT, Chuang TH and Bokoch GM (1998) p21-activated kinase (PAK) is required for Fas-induced JNK activation in Jurkat cells. *J Immunol* 160: 7-11.
91. Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, et al. (1999) Actn1 is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401: 168-173.
92. Ricci JE, Gottlieb RA and Green DR (2003) Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 160: 65-75.
93. Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bally-Maitre B, Perkins GA, et al. (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117: 773-786.

**Figure Legends**

**Figure 1 - Cerulenin and orlistat reduce cell viability and induce apoptosis in the melan-a cell line.** Melan-a cells were treated with increasing concentrations of cerulenin or orlistat for 24 or 48 h, respectively; cell viability was determined using trypan blue (A and B) or MTT assays (C and D), and apoptosis was determined by flow cytometry after Annexin V staining (E and F). The values represent the mean  $\pm$  s.e.m of at least three independent experiments. \*Significantly different from the respective control at  $p < 0.05$ .

**Figure 2 - FASN inhibitors blocked cell cycle progression in non-tumorigenic cells.** Melan-a cells were treated with 5  $\mu$ g/ml cerulenin or 30  $\mu$ M orlistat for 24 or 36 h, respectively. Then, the percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined by flow cytometry after PI staining (A). Western blot analysis of protein extracts prepared from cerulenin- and orlistat-treated melan-a cells revealed the accumulation of the p21WAF1/Cip1 tumor suppressor protein (B). The data were normalized using beta-actin as a loading control. The values represent the mean  $\pm$  s.e.m of at least five independent experiments. \*Significantly different from the respective control at  $p < 0.05$ .

**Figure 3 - Treatment of melan-a cells with FASN inhibitors leads to the release of mitochondrial cytochrome c and the activation of caspases-3 and -9 but not -8.** Melan-a cells were treated with 5  $\mu$ g/ml cerulenin or 30  $\mu$ M orlistat for 12 or 24 h, respectively; then, the release of cytochrome c was determined by flow cytometry (A). The cells were also treated with cerulenin or orlistat under the same conditions, and the activation of caspase-3 was estimated using FITC-DEVD-FMK (B). The activities of caspase-9 and -8 (C and D) were determined as described in Material and Methods. The values represent the mean  $\pm$  s.e.m of at least three independent experiments. \*Significantly different from the respective control at  $p < 0.05$ .

**Figure 4 - FASN inhibitors result in decreased  $\Delta\Psi_m$  and increased superoxide production in melan-a cells.** Melan-a cells were treated with 5  $\mu\text{g/ml}$  cerulenin or 30  $\mu\text{M}$  orlistat for 24 or 48 h, respectively; then, approximately  $2 \times 10^5$  viable cells/ml were permeabilized with 15  $\mu\text{M}$  digitonin.  $\Delta\Psi_m$  was estimated by Safranin fluorescence. The arrows indicate the addition of 15  $\mu\text{M}$  digitonin, 100  $\mu\text{M}$  ADP, 5  $\mu\text{M}$  carboxyatractyloside (CAT) and 1  $\mu\text{M}$  CCCP (A and B, representative of at least three independent experiments). Melan-a cells were also treated with 5  $\mu\text{g/ml}$  cerulenin or 30  $\mu\text{M}$  orlistat for 24 or 48 h, respectively; the cells were then washed and probed with 5  $\mu\text{M}$  MitoSOX (C). The values represent the mean  $\pm$  s.e.m of six independent experiments. \*Significantly different from the respective control at  $p < 0.05$ .

**Figure 5 - Treatment with FASN inhibitors promotes the inhibition of respiration in melan-a cells.** Oxygen consumption by the melan-a cells was measured after treatment for 24 h with 5  $\mu\text{g/ml}$  cerulenin (A) or for 48 h with 30  $\mu\text{M}$  orlistat (B) using high-resolution respirometry (Oroboros) in a closed chamber equipped with a magnetic stirrer and temperature control set to  $37^\circ\text{C}$ . Approximately  $2 \times 10^5$  viable cells/ml were permeabilized with 15  $\mu\text{M}$  of digitonin and then were added to 2 ml of reaction medium (described in Materials and Methods). Analyses of oxidative phosphorylation and respiratory activity of the mitochondria were made by sequential additions of 300  $\mu\text{M}$  ADP, 2  $\mu\text{g/ml}$  oligomycin, 100 nM carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), 5 mM succinate, 0.5  $\mu\text{M}$  antimycin and 200  $\mu\text{M}$  N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) with 2 mM ascorbate (A-D). The activity of citrate synthase was measured in melan-a cells after 24 or 48 h of treatment with 5  $\mu\text{g/ml}$  cerulenin or 30  $\mu\text{M}$  orlistat (E). The values represent the mean  $\pm$  s.e.m of at least four independent experiments. \*Significantly different from the respective control at  $p < 0.05$ .

**Figure 6 - NAC pre-incubation protects melan-a cells from cerulenin or orlistat-induced apoptosis.** Melan-a cells were pre-incubated with 5 mM NAC for 1 h, followed by treatment with 5 µg/ml cerulenin for an additional 24 h (A) or 30 µM orlistat for 48 h (B). Apoptosis was then determined by flow cytometry after Annexin V staining. The values represent the mean ± s.e.m of six independent experiments. \*Significantly different from the respective control at  $p<0.05$ . #Significantly different from the respective condition in the absence of NAC at  $p<0.05$ .

**Figure 7 - FASN silencing does not induce apoptosis in melan-a cells.** Melan-a cells were transfected with specific siRNAs and incubated for 48 h. FASN protein content was determined by Western blot analysis (A), and apoptosis was estimated by flow cytometry after Annexin V staining (B). The values represent the mean ± s.e.m of three independent experiments.

**Supplemental Figure 1 - Cerulenin and orlistat reduce cell viability and induce apoptosis in the HaCaT cell line.** HaCaT cells were treated with increasing concentrations of cerulenin or orlistat for 24 or 48 h, respectively; cell viability was determined using trypan blue (A and B) or MTT assays (C and D), and apoptosis was determined by flow cytometry (E and F). The values represent the mean ± s.e.m of at least three independent experiments. \*Significantly different from the respective control at  $p<0.05$ .

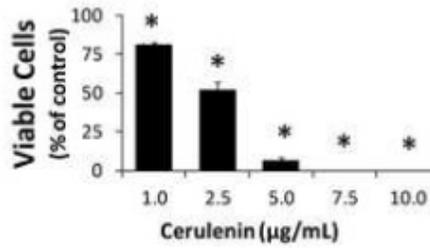
**Supplemental Figure 2 – The fraction of FASN protein is higher in melan-a than HaCaT cells.** Equal amounts of total protein (40 µg) were electrophoretically separated, and the membranes were incubated with antibodies against FASN or beta-actin. Western blot analysis showed that the FASN content was 2.3-fold higher in the melan-a cells than in the HaCaT cells (0.678 versus 0.294 a.u., melan-a versus HaCaT; data normalized using beta-actin).

**Supplemental Figure 3 - FASN inhibitors blocked cell cycle progression in non-tumorigenic cells.** HaCaT cells (A) were treated with 5 µg/ml cerulenin or 30 µM orlistat for 24 or 48 h, respectively. Then, the percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined by flow cytometry after PI staining. Western blot analysis of the protein extracts prepared from cerulenin- and orlistat-treated HaCaT cells revealed the accumulation of p21WAF1/Cip1 tumor suppressor protein; the data were normalized using beta-actin as a loading control (B). The values represent the mean ± s.e.m of at least five independent experiments. \*Significantly different from the respective control at  $p < 0.05$ .

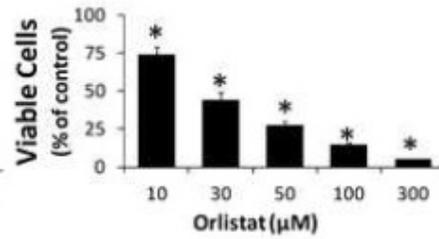
**Supplemental Figure 4 - FASN inhibitor-induced apoptosis is independent of mitochondrial permeability transition or p53 in melan-a cells.** Melan-a cells were treated with 5 µg/ml cerulenin or 30 µM orlistat for 24 or 48 h, respectively, in the presence of cyclosporin A (CsA, 1 µM) (A) or (B) pifithrin-alpha (PFT, 10 µM); then, apoptosis was determined by flow cytometry after Annexin V staining. The values represent the mean ± s.e.m of five independent experiments. \*Significantly different from the respective control at  $p < 0.05$ .

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

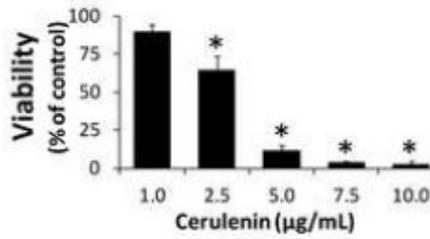
### A - Trypan Blue



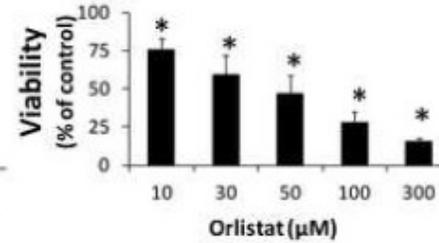
### B - Trypan Blue



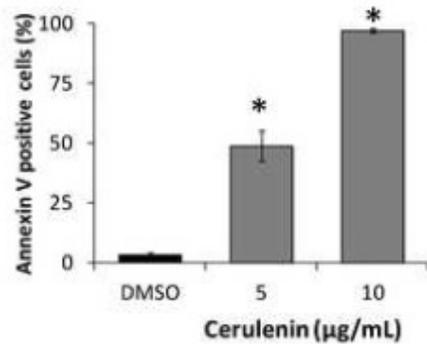
### C - MTT



### D - MTT



### E - Apoptosis



### F - Apoptosis

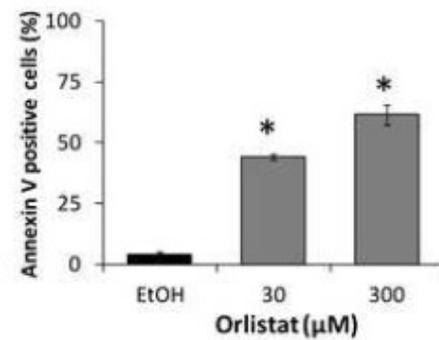


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

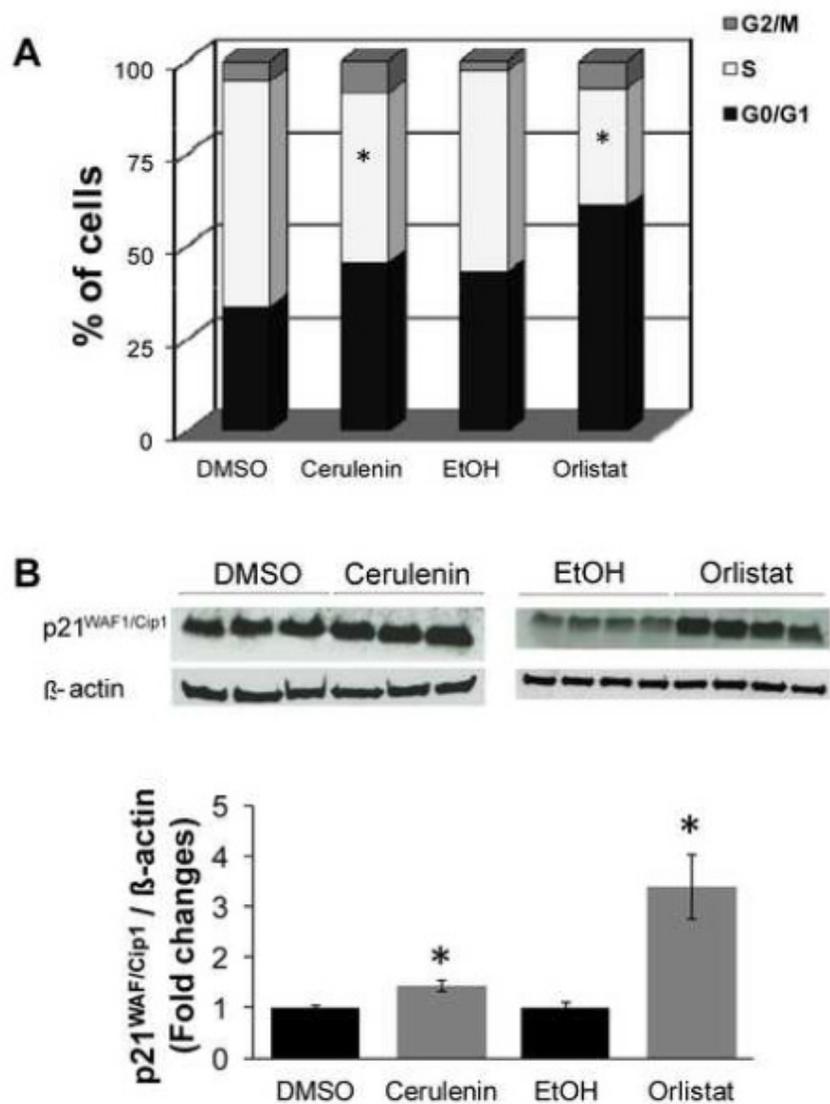


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

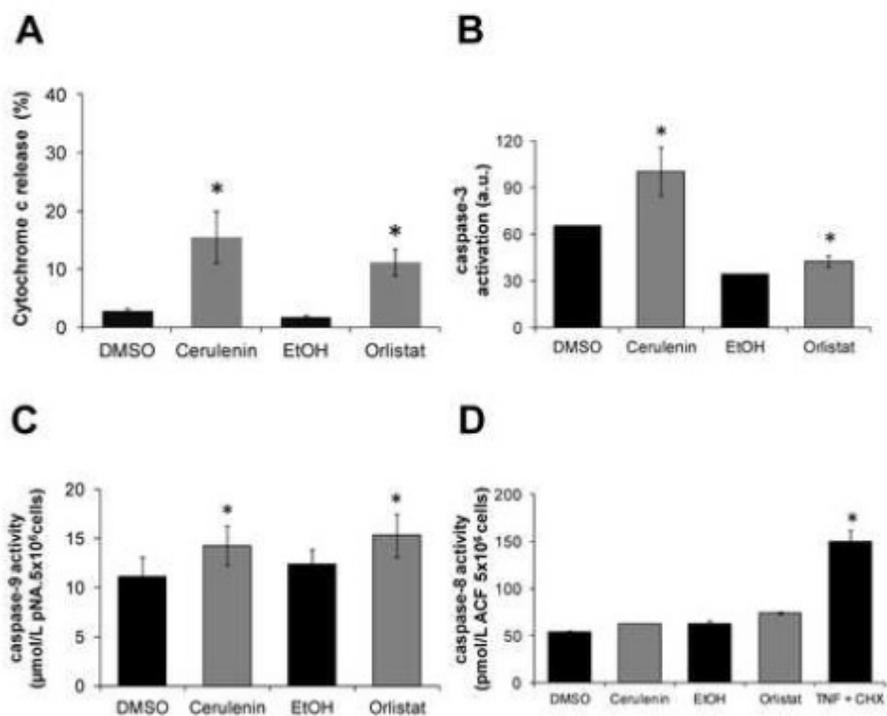


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)

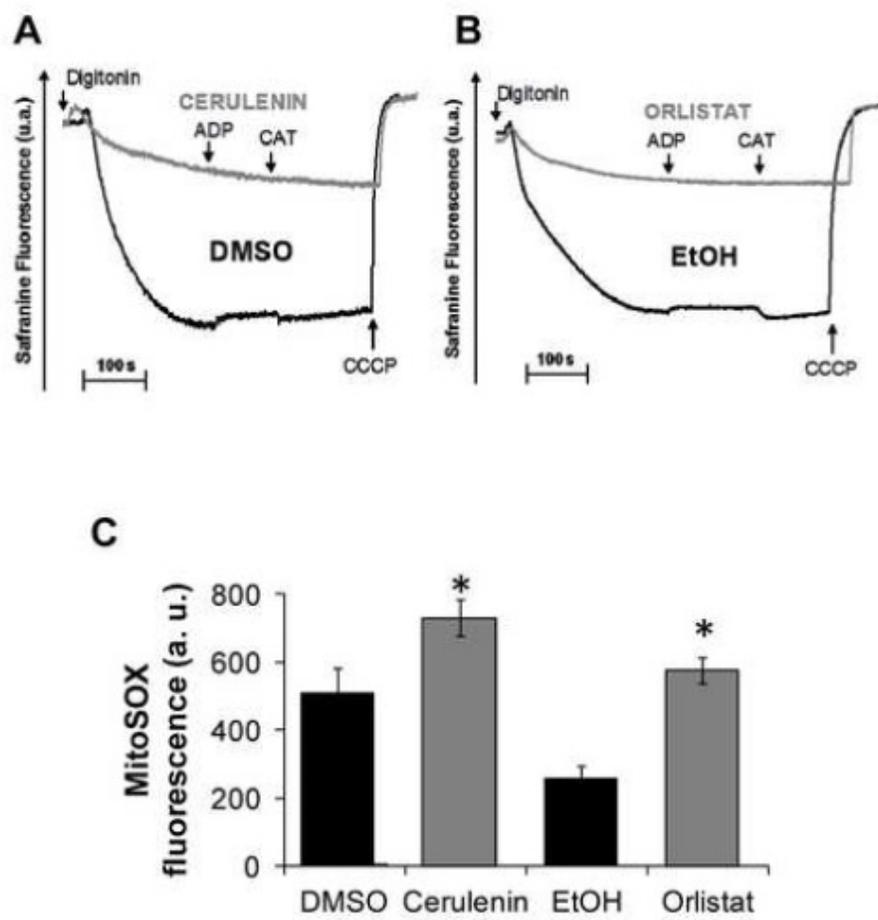


Figure 5  
[Click here to download high resolution image](#)

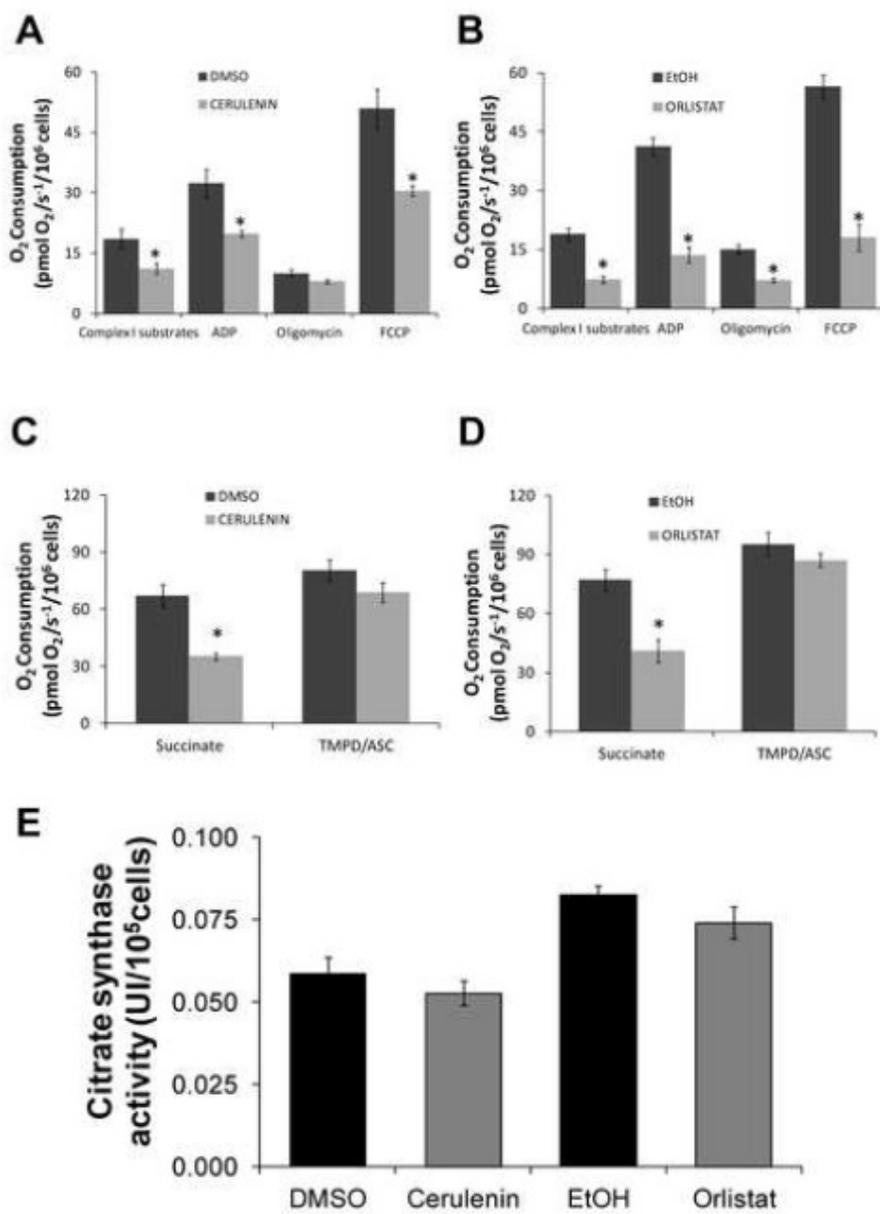


Figure 6  
[Click here to download high resolution image](#)

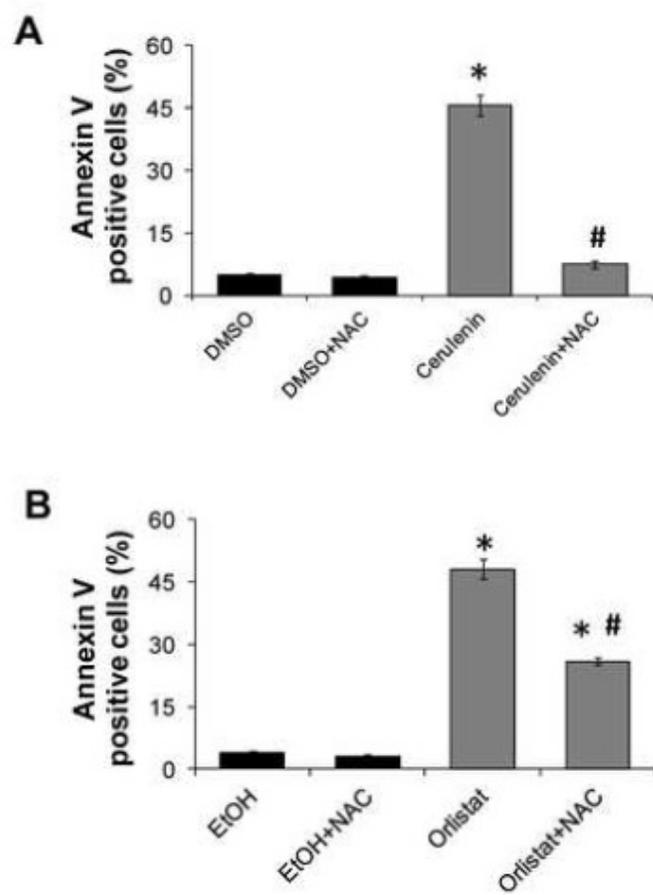
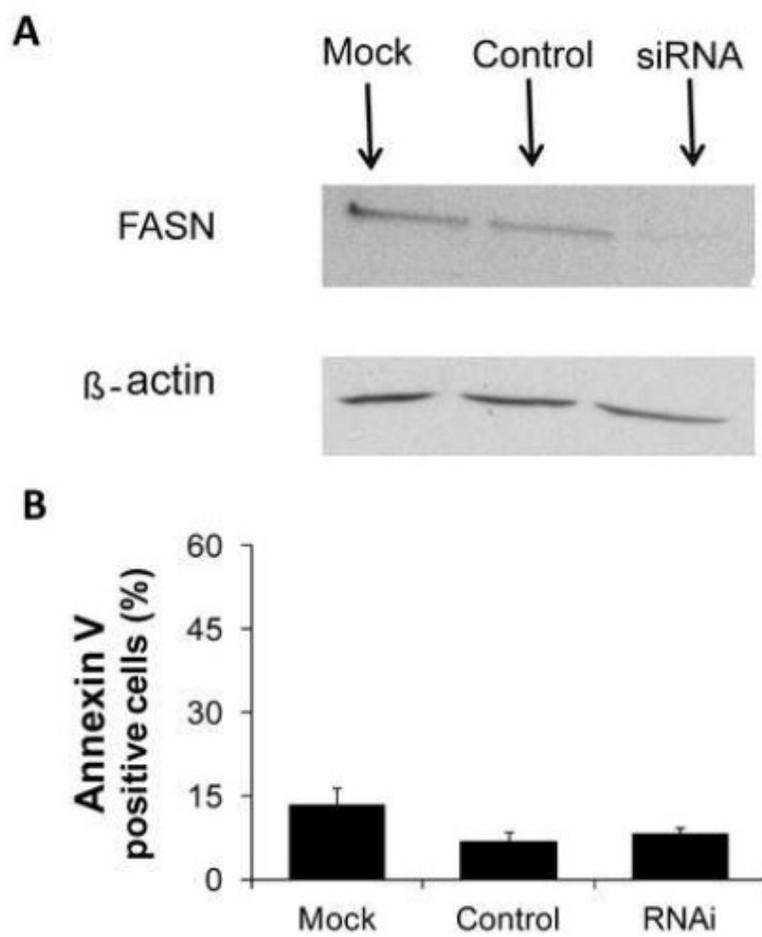
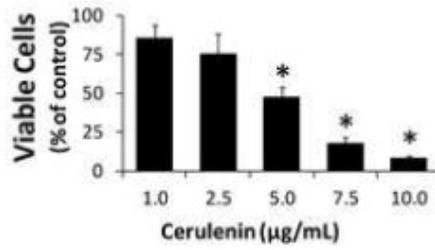


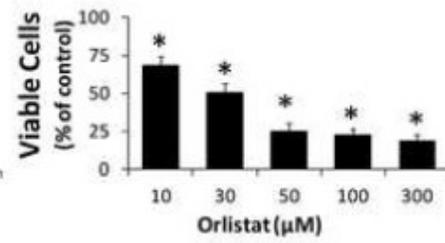
Figure 7  
[Click here to download high resolution image](#)



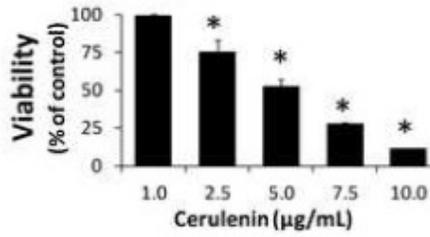
**A - Trypan Blue**



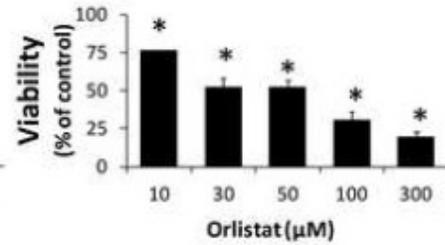
**B - Trypan Blue**



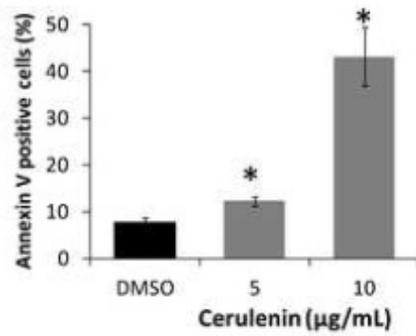
**C - MTT**



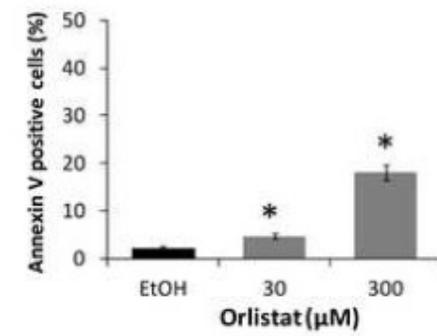
**D - MTT**

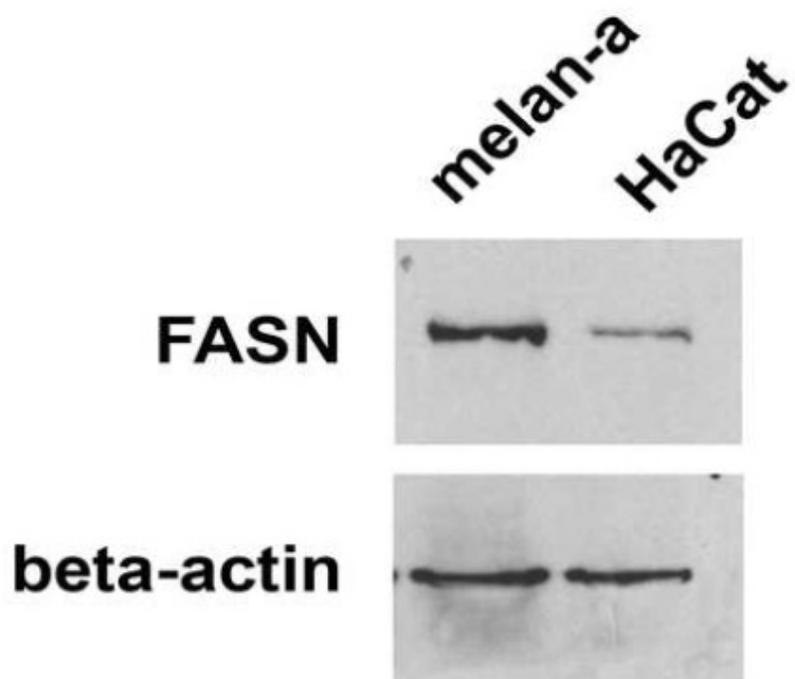


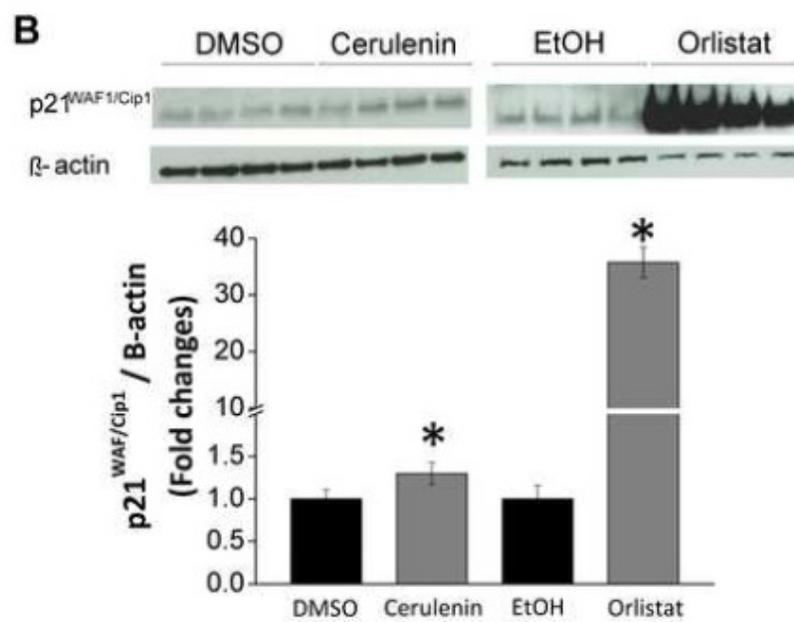
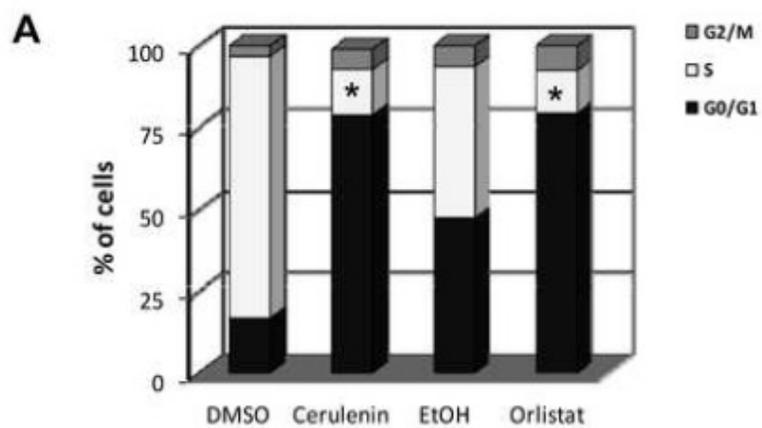
**E - Apoptosis**

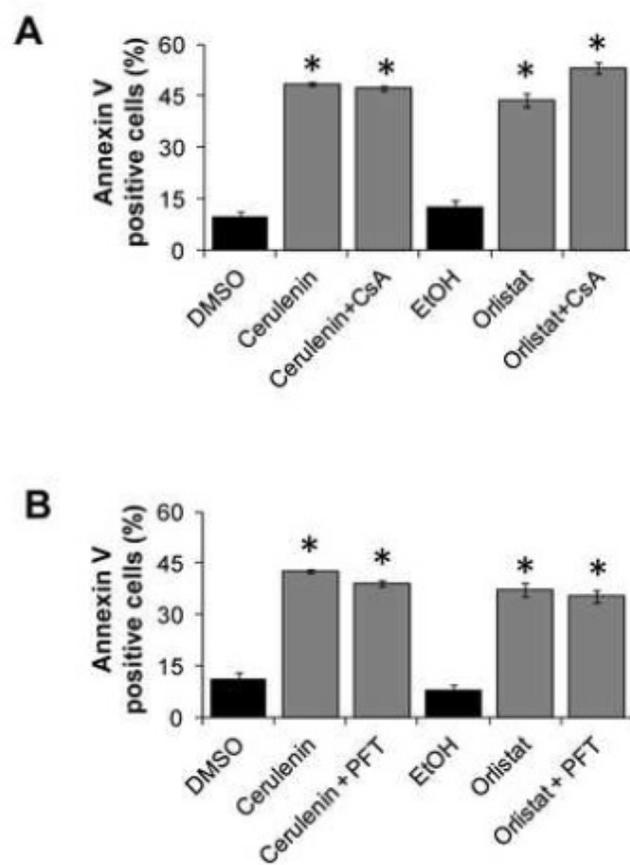


**F - Apoptosis**









## *Capítulo II*

---



## ANÁLISE PROTEÔMICA

A análise proteômica é uma importante ferramenta de análise da expressão protéica no genoma tecidual, celular, entre outras condições. A regulação protéica possui diversas funções, tais como atua em processos bioquímicos e regulatórios de crescimento, sobrevivência celular e também na morte celular.

No **Capítulo I**, vimos que o tratamento das células melan-a com cerulenina ou orlistat induz morte celular pela ativação da via intrínseca da apoptose, acompanhada por disfunção mitocondrial ligada ao estresse oxidativo. Esta disfunção demonstrou redução do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), aumento da produção de superóxido, e inibição da respiração mitocondrial nas melan-a tratadas com os inibidores de FASN. Nossos resultados também indicam que essa apoptose seja independente da inibição da atividade de FASN pela cerulenina e orlistat.

Além de verificar alterações na função mitocondrial, buscamos ver se o tratamento com cerulenina ou orlistat também induz alterações no proteoma das mitocôndrias das células melan-a. Para isso, utilizamos mitocôndrias isoladas das células melan-a após o tratamento com 5  $\mu\text{g/mL}$  de cerulenina ou com 30  $\mu\text{M}$  de orlistat durante 24 e 48 h, respectivamente. Em seguida, normalizamos o conteúdo de proteínas das amostras por Bradford e submetemos estas frações mitocondriais à análise proteômica por utilizando-se cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Foram utilizadas amostras de células controle e tratadas com orlistat provenientes de três experimentos independentes.

A análise da expressão diferencial das proteínas identificadas foi realizada pela razão das contagens de espectros normalizados (*normalized spectral counts*). Nessa análise, foram identificadas 63 proteínas originadas do enriquecimento das mitocôndrias das células melan-a após o tratamento com 30  $\mu\text{M}$  de orlistat, e seu respectivo controle EtOH conforme mostrado na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Proteínas identificadas em frações mitocondriais enriquecidas de células melan-a após tratamento com orlistat, por LC-MS/MS, de acordo com a razão das contagens de espectros normalizados (*normalized spectral counts*). As alterações são referidas como *fold change*.

Número de acesso	Proteínas Identificadas	<i>normalized spectral counts</i>		UP/DOWN Fold Change
		EtOH	Orlistat	
IPI00110850 (+1)	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	9.7	10.7	-
IPI00307837	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	13.0	10.0	-
IPI00554929	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	13.0	10.0	-
IPI00117352	<i>Tubulin beta-5 chain</i>	16.0	8.7	down
IPI00133903 (+1)	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	7.0	15.7	up
IPI00271869 (+5)	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5.0	8.3	-
IPI00323357	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	11.3	5.7	down
IPI00121788 (+2)	<i>Peroxiredoxin-1</i>	6.0	5.3	-
IPI00468481	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	5.0	2.0	down
IPI00407339	<i>Histone H4</i>	7.0	6.0	-
IPI00466069	<i>Elongation factor 2</i>	5.7	7.0	-
IPI00407130	<i>Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2</i>	3.3	7.7	up
IPI00462072 (+1)	<i>Alpha-enolase</i>	6.0	5.0	-
IPI00323592	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	3.5	2.0	down
IPI00116498	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	4.7	5.0	-
IPI00554989	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	6.3	4.0	down
IPI00114642 (+6)	<i>Histone H2B type 1-F/J/L</i>	4.7	4.7	-
IPI00117348	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	6.3	3.3	down
IPI00319994 (+1)	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	3.3	2.7	-
IPI00123181	<i>Myosin-9</i>	5.0	10.0	-
IPI00227299 (+1)	<i>Vimentin</i>	4.0	4.0	-
IPI00118676 (+1)	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	5.7	1.5	-
IPI00230264	<i>Histone H2A.x</i>	3.0	3.7	-
IPI00308885	<i>Isoform 1 of 60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	2.3	4.0	up
IPI00622235	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	4.0	4.5	-
IPI00467833 (+1)	<i>triosephosphate isomerase</i>	5.5	2.5	down
IPI00221402 (+1)	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	3.5	1.7	-
IPI00127841	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	1.7	2.7	up
IPI00990246	<i>Nucleoside diphosphate kinase</i>	2.7	0.0	-
IPI00130280	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	0.5	5.5	-
IPI00136984 (+1)	<i>40S ribosomal protein S7</i>	4.0	4.0	-
IPI00110588	<i>Moesin</i>	2.7	2.5	-
IPI00313222 (+2)	<i>60S ribosomal protein L6</i>	3.5	1.7	-
IPI00323881	<i>Importin subunit beta-1</i>	1.5	1.7	-
IPI00118899 (+2)	<i>Alpha-actinin-4</i>	1.3	3.0	-
IPI00555023 (+1)	<i>Glutathione S-transferase P 1</i>	2.3	3.0	-

IPI00317590 (+3)	<i>40S ribosomal protein S18</i>	1.0	0.5	-
IPI00226993	<i>Thioredoxin</i>	1.0	0.0	-
IPI00114733	<i>Serpin H1</i>	1.0	2.5	-
IPI00228633	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	1.0	2.3	-
IPI00354819 (+2)	<i>Isoform Smooth muscle of Myosin light polypeptide 6</i>	1.5	3.0	<i>up</i>
IPI00311236 (+2)	<i>60S ribosomal protein L7</i>	2.0	3.0	-
IPI00223713 (+1)	<i>Histone H1.2</i>	1.3	0.0	-
IPI00314950 (+1)	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>	3.5	1.0	-
IPI00319992	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	-	4.0	-
IPI00111218	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	1.0	7.0	-
IPI00128904	<i>Poly(rC)-binding protein 1</i>	1.3	1.5	-
IPI00133440 (+2)	<i>Prohibitin</i>	0.0	2.0	-
IPI00555069	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	1.0	2.0	-
IPI00230730 (+8)	<i>Histone H3.2</i>	2.0	0.0	-
IPI00330804	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	4.3	4.0	-
IPI00318492 (+12)	<i>Putative uncharacterized protein</i>	3.0	-	-
IPI00134621	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>	3.5	-	-
IPI00454008	<i>Serine hydroxymethyltransferase</i>	1.0	4.0	-
IPI00118384	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	4.0	2.7	<i>down</i>
IPI00468203	<i>Annexin A2</i>	0.0	2.0	-
IPI00129685	<i>Translationally-controlled tumor protein</i>	2.5	-	-
IPI00153400 (+4)	<i>Histone H2A.J</i>	3.7	3.0	-
IPI00108125 (+2)	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</i>	1.7	-	-
IPI00123639	<i>Calreticulin</i>	1.5	2.0	-
IPI00317740	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</i>	2.0	1.0	-
IPI00139780 (+1)	<i>60S ribosomal protein L23</i>	1.5	-	-
IPI00331092 (+1)	<i>40S ribosomal protein S4, X isoform</i>	1.0	-	-
IPI00137736	<i>40S ribosomal protein S28</i>	1.0	-	-
IPI00111013 (+3)	<i>Cathepsin D</i>	-	2.0	-
IPI00230133	<i>Histone H1.5</i>	3.0	-	-
IPI00754386	<i>ERO1-like protein alpha</i>	-	2.0	-
IPI00113141 (+1)	<i>Citrate synthase, mitochondrial</i>	-	2.0	-
IPI00121079 (+1)	<i>Isoform 1 of NADH-cytochrome b5 reductase 3</i>	-	2.0	-
IPI00311682 (+1)	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</i>	-	2.0	-
IPI00553798 (+1)	<i>AHNAK nucleoprotein isoform 1</i>	-	2.0	-

A análise da expressão das proteínas entre os tratamentos foi descrita por *fold change*. Segundo esta análise, as proteínas identificadas em frações mitocondriais enriquecidas de células melan-a após tratamento com orlistat, por LC-MS/MS, e que apresentaram razão de 1,5x das contagens de espectros normalizados consideradas **aumentadas** enquanto as proteínas identificadas com razão menor que 0,65x foram consideradas **diminuídas** (Wilkins, Homer *et al.*, 2002; Wilkins, Beighton *et al.*, 2003; Paes Leme, Bellato *et al.*, 2008).

Na **Tabela 4** pode-se observar que o tratamento com orlistat modificou a expressão de 11 proteínas nas mitocôndrias das células melan-a quando comparadas ao controle. Dentre estas, houve aumento da *heat shock protein* (HSP60) e do translocador de nucleotídeo de adenina ANT2, assim como redução dos níveis da malato desidrogenase MDH2, após tratamento com orlistat.

**Tabela 4.** Lista de Proteínas com expressão aumentada ou diminuída obtida pela razão das contagens de espectros (*fold-change*) entre o número de peptídeos do grupo tratado com orlistat e grupo controle (tratado com EtOH) em mitocôndrias das células melan-a por LC-MS/MS.

<b>Proteínas com conteúdo modificadas após tratamento em relação ao controle (Orlistat versus EtOH)</b>	
<b>Aumentadas</b>	<b>Diminuídas</b>
<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	<i>Tubulin beta-5 chain</i>
<i>Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2</i>	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>
<i>Isoform 1 of 60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>
<i>ADP/ATP translocase 2</i>	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>
	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>
	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>
	<i>triosephosphate isomerase</i>

Por outro lado, o tratamento com 5 µg/mL de cerulenina durante 24 h permitiu a identificação de 75 proteínas nas mitocôndrias das células melan-a (**Tabela 5**). Destas, cerca de 19 proteínas mostraram alteração de expressão após o tratamento com cerulenina (**Tabela**

6). O tratamento com cerulenina resultou em aumento da *heat shock protein* (HSP60) e redução dos níveis da malato desidrogenase MDH2.

**Tabela 5.** Proteínas identificadas em frações mitocondriais enriquecidas de células melan-a após tratamento com cerulenina, por LC-MS/MS, de acordo com a razão das contagens de espectros normalizados.

Número de acesso	Proteínas Identificadas	normalized spectral counts		UP/ DOWN Fold Changes
		DMSO	Cerulenina	
IPI00110850 (+1)	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	29.0	36.0	-
IPI00307837	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	26.7	19.3	-
IPI00468481	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	25.7	34.0	-
IPI00117352	<i>Tubulin beta-5 chain</i>	22.3	20.0	-
IPI00554929	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	20.3	19.7	-
IPI00462072 (+2)	<i>Alpha-enolase</i>	17.0	15.0	-
IPI00273646 (+3)	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	17.3	19.7	-
IPI00308885	<i>Isoform 1 of 60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	9.0	20.0	up
IPI00323357	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	10.7	9.3	-
IPI00133903 (+1)	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	9.3	13.3	-
IPI00466069	<i>Elongation factor 2</i>	10.0	8.7	-
IPI00323592	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	8.5	4.5	down
IPI00407339	<i>Histone H4</i>	11.7	6.7	down
IPI00117348	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	10.3	3.7	down
IPI00114642 (+10)	<i>Histone H2B type 1-F/J/L</i>	10.7	6.3	down
IPI00407130 (+1)	<i>Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2</i>	6.3	5.3	-
IPI00227299 (+1)	<i>Vimentin</i>	7.7	7.0	-
IPI00354819 (+2)	<i>Isoform Smooth muscle of Myosin light polypeptide 6</i>	8.0	6.3	-
IPI00123181	<i>Myosin-9</i>	5.7	7.7	-
IPI00467833 (+1)	<i>triosephosphate isomerase</i>	6.7	6.7	-
IPI00127841	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	3.7	3.7	-
IPI00130280	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	5.0	5.7	-
IPI00114733	<i>Serpin H1</i>	2.3	4.3	up
IPI00221463 (+4)	<i>Histone H2A type 3</i>	7.0	4.0	down
IPI00551538 (+5)	<i>histone H3.3-like isoform 1</i>	1.0	2.0	up
IPI00121788	<i>Peroxiredoxin-1</i>	2.7	3.7	-
IPI00454008	<i>Serine hydroxymethyltransferase</i>	4.0	6.0	up
IPI00407543 (+1)	<i>Putative uncharacterized protein</i>	5.0	5.7	-
IPI00223714	<i>Histone H1.4</i>	5.3	4.0	down
IPI00230108	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	2.3	3.7	-
IPI00554989	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	5.7	4.3	-
IPI00230264	<i>Histone H2A.x</i>	6.7	3.0	down
IPI00555023 (+1)	<i>Glutathione S-transferase P 1</i>	4.3	4.3	-
IPI00118899	<i>Alpha-actinin-4</i>	2.7	6.3	-

IPI00330804	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	11.3	13.3	-
IPI00321190 (+5)	<i>Sulfated glycoprotein 1</i>	2.0	4.7	up
IPI00319992	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	2.5	3.3	up
IPI00311236 (+2)	<i>60S ribosomal protein L7</i>	3.3	2.7	-
IPI00319994 (+1)	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	4.0	2.0	down
IPI00111218	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	3.0	1.0	down
IPI00265107 (+6)	<i>Uncharacterized protein</i>	1.0	0.3	down
IPI00123639	<i>Calreticulin</i>	1.0	4.0	-
IPI00116498	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	1.3	2.3	-
IPI00113517	<i>Cathepsin B</i>	2.7	3.3	up
IPI00127417 (+3)	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	2.0	1.0	down
IPI00118676 (+1)	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	1.7	3.0	up
IPI00221402	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	2.0	2.0	-
IPI00622235	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	4.0	2.0	-
IPI00113141	<i>Citrate synthase, mitochondrial</i>	1.0	5.0	-
IPI00113223	<i>Fatty acid synthase</i>	1.7	3.0	-
IPI00405058 (+3)	<i>Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	2.0	-	-
IPI00137331 (+1)	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>	2.5	2.5	-
IPI00129526	<i>Endoplasmic reticulum chaperone protein</i>	4.0	3.3	-
IPI00313222 (+2)	<i>60S ribosomal protein L6</i>	4.5	-	-
IPI00128904	<i>Poly(rC)-binding protein 1</i>	2.0	1.0	-
IPI00123604 (+2)	<i>40S ribosomal protein SA</i>	2.0	0.0	-
IPI00457898	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	0.5	0.0	-
IPI00317309	<i>Annexin A5</i>	1.0	2.0	-
IPI00849793 (+1)	<i>60S ribosomal protein L12</i>	0.5	2.0	-
IPI00317590 (+3)	<i>40S ribosomal protein S18</i>	1.5	0.0	-
IPI00230133	<i>Histone H1.5</i>	1.0	-	-
IPI00222496	<i>Putative uncharacterized protein</i>	1.0	4.0	-
IPI00224575 (+2)	<i>Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>	2.0	-	-
IPI00555069	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	2.0	-	-
IPI00118775 (+4)	<i>Uncharacterized protein</i>	0.5	-	-
IPI00121280 (+10)	<i>Glutathione S-transferase Mu 7</i>	1.0	2.0	-
IPI00129685	<i>Translationally-controlled tumor protein</i>	2.0	-	-
IPI00117312	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	-	1.0	-
IPI00230440	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	1.0	-	-
IPI00396797 (+4)	<i>Isoform 1 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17</i>	1.0	-	-
IPI00112414 (+2)	<i>Exportin-2</i>	1.0	-	-
IPI00127109 (+1)	<i>Uncharacterized protein</i>	1.0	-	-
IPI00222430 (+3)	<i>acyl-CoA-binding protein isoform 1</i>	1.0	-	-

**Tabela 6.** Lista de Proteínas com expressão aumentada ou diminuída obtida pela razão das contagens de espectros (*fold-change*) entre o número de peptídeos do grupo tratado com cerulenina e grupo controle (tratado com DMSO) em mitocôndrias das células melan-a por LC-MS/MS.

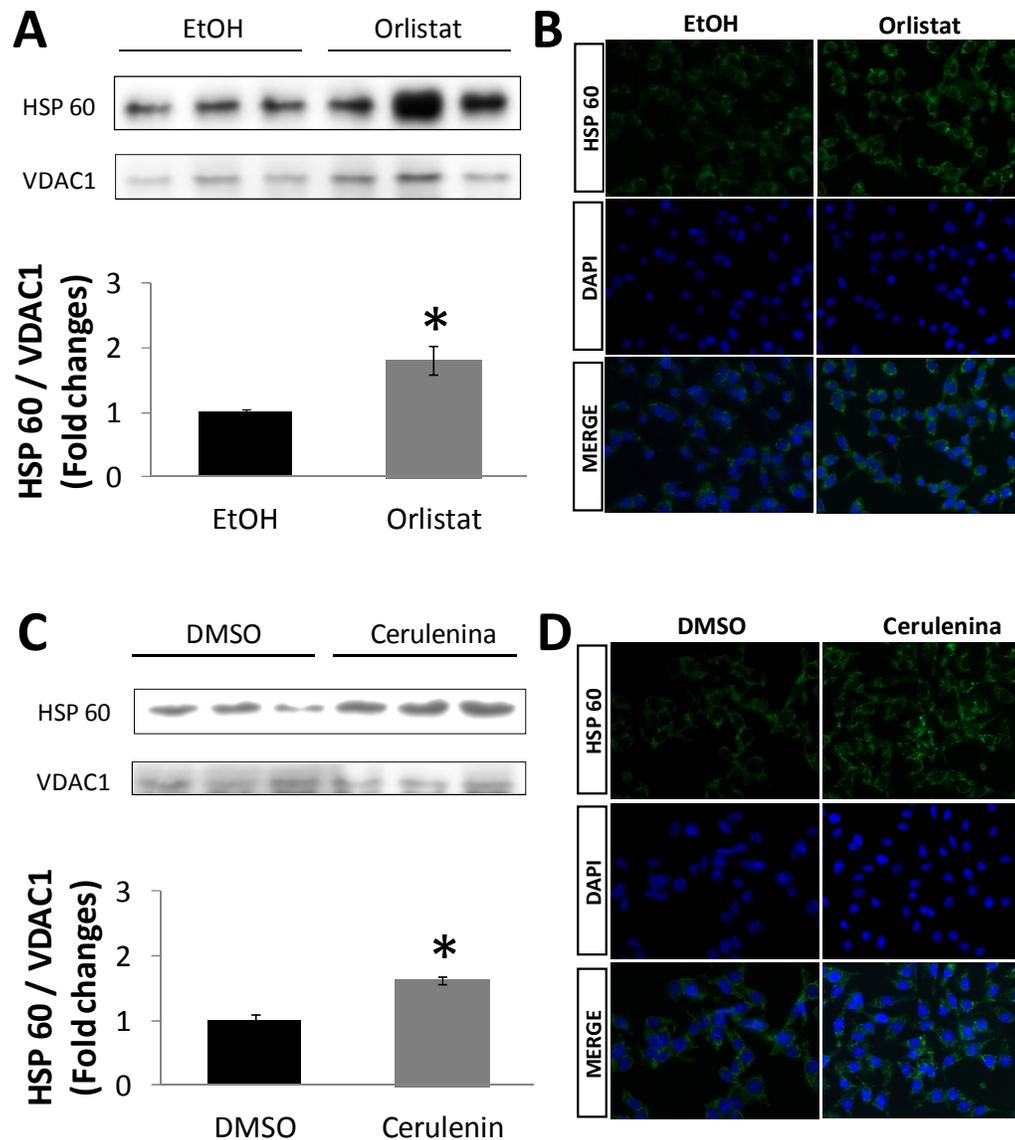
<b>Proteínas com conteúdo modificadas após tratamento em relação ao controle (Cerulenina versus DMSO)</b>	
<b>Aumentadas</b>	<b>Diminuídas</b>
<i>Isoform 1 of 60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>
<i>Serpin H1</i>	<i>Histone H4</i>
<i>histone H3.3-like isoform 1</i>	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>
<i>Serine hydroxymethyltransferase</i>	<i>Histone H2B type 1-F/J/L</i>
<i>Sulfated glycoprotein 1</i>	<i>Histone H2A type 3</i>
<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	<i>Histone H1.4</i>
<i>Cathepsin B</i>	<i>Histone H2A.x</i>
<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>
	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>
	<i>Uncharacterized protein</i>
	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>

A análise das proteínas identificadas por LC-MS/MS revelou alterações pontuais associadas à função mitocondrial após o tratamento com os inibidores de FASN nas células melan-a. Os resultados de *heat shock protein* de 60 kDa (HSP60), malato desidrogenase 2 (MDH2) e do translocador de nucleotídeo de adenina 2 (ANT2) foram validados por Western blotting e/ou por imunofluorescência.

Inicialmente investigamos a expressão da proteína mitocondrial *heat shock protein* de 60 Kda (HSP60) por Western blot. As *heat shock proteins* também conhecidas como chaperonas, fazem parte de uma família de proteínas com massas moleculares que variam de 8 a 170 kDa, cujo os membros são referidos com HSP27, HSP 60, HSC70 (forma constitutiva), HSP70 (forma induzível) e HSP90. Estas proteínas são classicamente identificadas por serem induzidas após tratamento térmico em células de mamíferos (Rossi, Somji *et al.*, 2002). Diversas delas incluindo-se a HSP60 desempenham importante papel na homeostase mitocondrial de proteínas, estando associadas a um estado de estresse oxidativo

(Pellegrino, Nargund *et al.*, 2013; Whelan e Zuckerbraun, 2013). A resposta ao estresse ou *Heat shock* é um mecanismo conservado de defesa muito usado pelas células ou tecidos para sua proteção frente a diversas situações como estresse oxidativo, hipertermia, inflamação e dano isquêmico/reperfusão (Hightower, 1991; Welch, 1992; Minowada e Welch, 1995). A principal resposta característica após as células serem expostas ao estresse consiste em alterações na expressão gênica celular, o que implica em parada na síntese proteica e indução da síntese das *heat shock protein*. O aumento da expressão das *heat shock protein* faz com que as células reconheçam as proteínas danificadas, e permite a restauração ou a eliminação das proteínas através das vias de degradação (Hightower, 1991; Welch, 1992; Minowada e Welch, 1995). Se a situação de estresse cessar ou for interrompida, a resposta *heat shock* é *down-regulated* e a síntese protéica normal é reestabelecida e, como resultado, as células se recuperam desse evento de estresse. Caso o estresse gerado seja intenso ou permaneça, a resposta *heat shock* será insuficiente para conter este estímulo, o que resultará na morte celular tanto por apoptose quanto necrose (Rossi, Somji *et al.*, 2002).

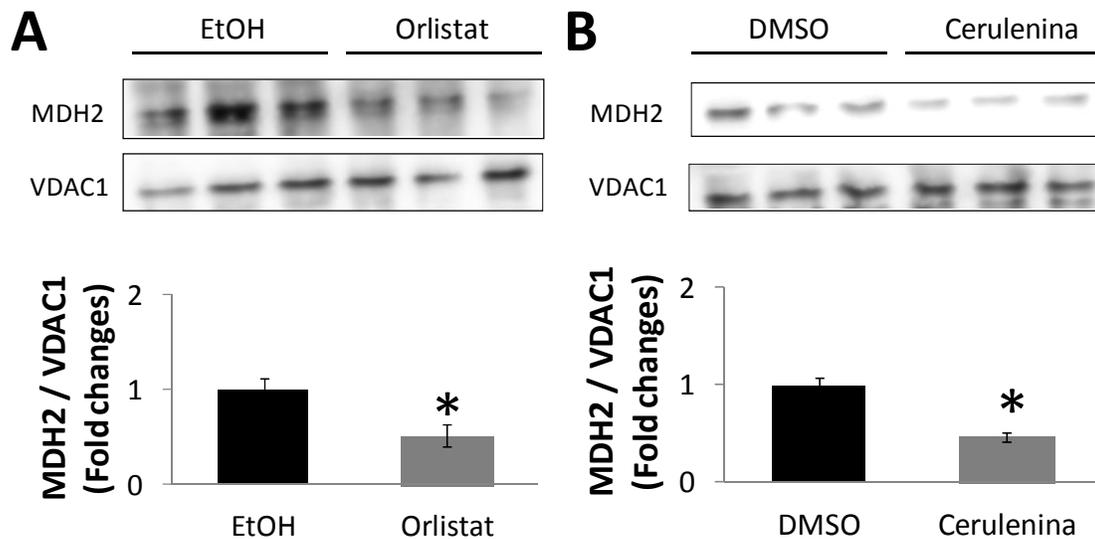
O tratamento com ambos os inibidores de FASN, cerulenina e orlistat, induziram aumento da proteína HSP60 nas células melan-a, como mostrado nas **Tabelas 4 e 6**. A análise por Western blot confirmou esse aumento nos níveis de HSP60, tendo sido de 82% nas células tratadas com orlistat em relação ao controle (EtOH - **Fig. 5 A**), e de 63% após o tratamento com cerulenina, em relação ao controle (DMSO - **Fig. 5 C**). É possível observar, por imunofluorescência, a marcação somente para a proteína HSP60, seguida pela marcação nuclear com DAPI e imagens mostrando a colocalização referidas como *merge* nas **Figs 5 B e D**. Nossos resultados demonstram que ambos os tratamentos, com cerulenina ou orlistat, induziram aumento da expressão proteica de HSP60, sendo que estudos evidenciam que a HSP60 por si, pode causar inflamação e apoptose (Kobba, Kim *et al.*, 2011), bem como acelerar a ativação de caspase-3 (Samali, Cai *et al.*, 1999; Gupta e Knowlton, 2005).



**Fig. 5: Orlistat e cerulenina aumentaram a expressão de HSP60 em células melan-a.** As células melan-a foram tratadas com 30  $\mu$ M de orlistat durante 48 h ou com 5  $\mu$ g/mL de cerulenina durante 24 h. O conteúdo da proteína mitocondrial HSP60 nas células melan-a foi determinado por Western blotting (**A** e **C**) e confirmado por imunofluorescência (**B** e **D**); as imagens mostram a fluorescência da HSP60, a marcação nuclear com DAPI e “merge” (colocalização). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de ao menos 3 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , tratamento *versus* controle, teste *t* de Student. Os valores foram normalizados usando VDAC1.

Em seguida, foram verificados os níveis de expressão da proteína MDH2 por Western blot após o tratamento com orlistat ou cerulenina nas mitocôndrias das células melan-a. A malato desidrogenase mitocondrial (MDH2) é uma importante enzima do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), que regula a conversão de malato/NAD em oxaloacetato/NADH (Goward e Nicholls, 1994; Reisch e Elpeleg, 2007; Liu, Harvey *et al.*, 2013). Esta enzima também age em outras vias metabólicas, como síntese de amino ácidos, gliconeogênese, manutenção do balanço oxidação/redução, além de facilitar a troca de metabólitos entre o citoplasma e as organelas intracelulares. O NADH gerado pela MDH2 torna-se um substrato metabólico para fosforilação oxidativa mitocondrial e biossíntese de ATP na cadeia transportadora de elétrons (CTE), necessários para a respiração celular pelo consumo do oxigênio molecular (Pedersen, 2007; Murphy, 2009). A enzima MDH2 regula a etapa final do ciclo TCA na mitocôndria, promovendo diretamente a redução de equivalentes para a fosforilação oxidativa, responsáveis pela biossíntese de ATP, consumo de oxigênio e geração de espécies reativas de oxigênio (Goward e Nicholls, 1994; Reisch e Elpeleg, 2007).

O tratamento das células melan-a com os inibidores de FASN reduziu em aproximadamente 45% o conteúdo da proteína MDH2 quando comparado aos seus respectivos controles (**Fig. 6**). O silenciamento de MDH2 por shRNA em células de câncer de próstata elevou a produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo através de uma “ineficiência metabólica” mitocondrial (Liu, Harvey *et al.*, 2013).

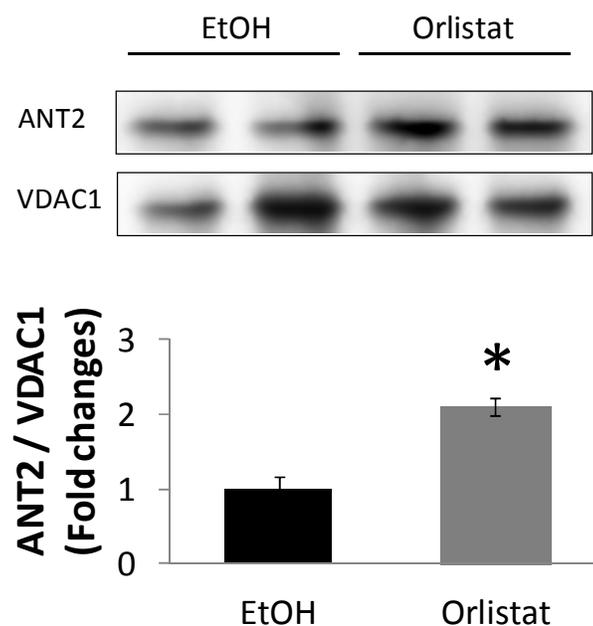


**Fig. 6: Orlistat e cerulenina diminuíram a expressão de MDH2 nas células melan-a.** Quantidades iguais de proteínas da fração mitocondrial de células melan-a tratadas com orlistat 30  $\mu$ M ou cerulenina 5  $\mu$ g/ml, durante 48 ou 24 h, respectivamente, foram eletroforéticamente separadas e as membranas foram incubadas com anticorpos contra MDH2 ou VDAC1. A análise por Western blotting mostra que ambos os tratamentos reduziram o conteúdo protéico de MDH2. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de ao menos 3 experimentos distintos; \* $p$ <0,05, tratamento *versus* controle, teste *t* de Student. Os valores foram normalizados usando VDAC1.

O tratamento das células melan-a com orlistat resultou em aumento do translocador de nucleotídeo de adenina ANT2 (**Tabela 4**). O translocador de nucleotídeo de adenina (ANT) é uma proteína codificada no núcleo e localizada na membrana interna mitocondrial. Esta proteína tem como função catalizar a troca de adenosina trifosfato da mitocôndria com adenosina difosfato citosólica. Portanto, ANT apresenta um importante papel no metabolismo energético mitocondrial por influenciar a fosforilação oxidativa na mitocôndria. Além do mais, ANT é o maior componente presente no complexo poro de transição mitocondrial (TPM), que interage com as proteínas da família Bcl2, contribuindo para a apoptose mediada pelas mitocôndrias (Chen, Gamou *et al.*, 1998; Dachs e Tozer, 2000). Existem quatro isoformas da ANT humana (ANT1, ANT2, ANT3 e ANT4) e a expressão relativa dessas isoformas são dependentes dos estágios de desenvolvimento, proliferação, bem como do tipo de tecido e célula (Lal, Peters *et al.*, 2001; Seagroves, Ryan *et al.*, 2001). A expressão de ANT2 é específica de células indiferenciadas ou tecidos que

são capazes de se proliferar ou regenerar, como linfócitos, rins e fígado. A participação de ANT2 durante a carcinogênese foi sugerida, visto que sua expressão em células neoplásicas está diretamente associada ao metabolismo da via glicolítica, e que diversos tumores malignos dependentes de hormônios apresentam aumento da expressão de ANT2 (Larm, Vaillant *et al.*, 1994; Simpson, Feeney *et al.*, 2000; Loiseau, Chevrollier *et al.*, 2002; Panneels, Schussler *et al.*, 2003). A diminuição ou “down regulation” de ANT2 inibe a proliferação celular e aumenta o  $\Delta\Psi_m$  em células tumorais de leucemia e fibrosarcoma promovendo sua quimiossensibilização, o que a torna uma oncoproteína antiapoptótica (Beltran, Mathur *et al.*, 2000; Mcclintock, Santore *et al.*, 2002; Semenza, 2002).

Conforme indicado na **Tabela 4**, o tratamento com 30  $\mu\text{M}$  de orlistat nas células não tumorigênicas melan-a induziu aumento de 1,1x no conteúdo de ANT2 verificado por Western blot, em relação às células controle, tratadas com EtOH (**Fig. 7**).



**Fig. 7: O inibidor de FASN orlistat aumentou a expressão da proteína mitocondrial ANT2 em células melan-a.** As células melan-a foram tratadas com 30  $\mu\text{M}$  de orlistat por 48 h. Após o tratamento, Western blotting foi realizado a partir de extratos protéicos de fração mitocondrial. O tratamento com orlistat aumentou a expressão da ANT2 nas células melan-a. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de ao menos 3 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , tratamento *versus* controle, teste *t* de Student. Os valores foram normalizados usando VDAC1.

Para compreender melhor estes achados, realizamos a análise de enriquecimento de termos provenientes de anotações do Gene Ontology (Ashburner, Ball *et al.*, 2000) pelo plugin ClueGO (Cytoscape) (Bindea, Mlecnik *et al.*, 2009; Smoot, Ono *et al.*, 2011; Saito, Smoot *et al.*, 2012) Essa análise de enriquecimento é um tipo comum de análise funcional que atribui valores de *score* e classifica os termos mais relevantes como de processos biológicos, componentes celulares, função molecular, entre outros (Bindea, Mlecnik *et al.*, 2009; Malik, Dulla *et al.*, 2010).

O aplicativo ClueGO é utilizado no programa Cytoscape para aumentar a interpretação biológica de grandes listas de genes. Integra termos do Gene Ontology, mas também de vias como KEGG/BioCarta, criando uma rede funcionalmente organizada em grupos. Os resultados exibem uma rede de termos agrupados de acordo com a anotação funcional (que reflete a similaridade entre os termos baseado na similaridade dos genes associados) e uma tabela com informações dos termos com seus genes associados e os respectivos valores de *p*.

**Tabela 7:** Termos enriquecidos para a lista de genes de *up vs down-regulated*, de acordo com anotações de **processos biológicos e componentes celulares** do GO. A identificação e o nome do termo, a porcentagem e a identificação dos genes associados, a ontologia utilizada e o valor de *p* corrigido pelo teste de Benjamini-Hocherg para o termo indicado são apresentados.

GO ID	Nome do termo	% de genes associados	Genes associados	term <i>p</i> -value corrected with Benjamini-Hochberg
GO:0042645	mitochondrial nucleoid	9.68	[Atp5b, Hspa9, Slc25a5]	0.0000
GO:0019362	pyridine nucleotide metabolic process	4.17	[Mdh2, Tpi1]	0.0047
GO:0046496	nicotinamide nucleotide metabolic process	4.17	[Mdh2, Tpi1]	0.0047
GO:0019682	glyceraldehyde-3-phosphate metabolic process	100.00	[Tpi1]	0.0051
GO:0002368	B cell cytokine production	50.00	[Hspd1]	0.0076
GO:0002842	positive regulation of T cell mediated immune response to tumor cell	33.33	[Hspd1]	0.0091
GO:0002840	regulation of T cell mediated immune response to tumor cell	33.33	[Hspd1]	0.0091
GO:0002424	T cell mediated immune response to tumor cell	33.33	[Hspd1]	0.0091
GO:0016461	unconventional myosin complex	25.00	[My16]	0.0101
GO:0035308	negative regulation of protein dephosphorylation	25.00	[Ywhae]	0.0101
GO:0006933	negative regulation of cell adhesion involved in substrate-bound cell migration	25.00	[Atp5b]	0.0101
GO:1901029	negative regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization	25.00	[Slc25a5]	0.0101
GO:0045261	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	20.00	[Atp5b]	0.0108
GO:0045298	tubulin complex	20.00	[Tubb5]	0.0108
GO:0046696	lipopolysaccharide receptor complex	20.00	[Hspd1]	0.0108
GO:0071817	MMXD complex	20.00	[Slc25a5]	0.0108
GO:0000974	Prp19 complex	20.00	[Hspa8]	0.0108
GO:0035305	negative regulation of dephosphorylation	16.67	[Ywhae]	0.0114
GO:0019907	cyclin-dependent protein kinase activating kinase holoenzyme complex	14.29	[Hspd1]	0.0118
GO:0006108	malate metabolic process	14.29	[Mdh2]	0.0118
GO:0006734	NADH metabolic process	12.50	[Mdh2]	0.0121
GO:0030049	muscle filament sliding	12.50	[My16]	0.0121
GO:0033275	actin-myosin filament sliding	11.11	[My16]	0.0124
GO:0006107	oxaloacetate metabolic process	11.11	[Mdh2]	0.0124
GO:0032727	positive regulation of interferon-alpha production	10.00	[Hspd1]	0.0126
GO:0042026	protein refolding	10.00	[Hspd1]	0.0126
GO:0005641	nuclear envelope lumen	9.09	[Tubb5]	0.0128
GO:0006740	NADPH regeneration	8.33	[Tpi1]	0.0130
GO:0048291	isotype switching to IgG isotypes	8.33	[Hspd1]	0.0130
GO:0006098	pentose-phosphate shunt	8.33	[Tpi1]	0.0130
GO:0002836	positive regulation of response to tumor cell	7.69	[Hspd1]	0.0131
GO:0051085	chaperone mediated protein folding requiring cofactor	7.69	[Hspa8]	0.0131
GO:1901028	regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization	7.69	[Slc25a5]	0.0131

GO:0002839	positive regulation of immune response to tumor cell	7.69	[Hspd1]	0.0131
GO:0043032	positive regulation of macrophage activation	7.69	[Hspd1]	0.0131
GO:0002834	regulation of response to tumor cell	7.69	[Hspd1]	0.0131
GO:0002837	regulation of immune response to tumor cell	7.69	[Hspd1]	0.0131
GO:0002418	immune response to tumor cell	7.14	[Hspd1]	0.0132
GO:0032647	regulation of interferon-alpha production	6.25	[Hspd1]	0.0142
GO:0032607	interferon-alpha production	6.25	[Hspd1]	0.0142
GO:0051084	'de novo' posttranslational protein folding	5.88	[Hspa8]	0.0143
GO:0033178	proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain	5.88	[Atp5b]	0.0143
GO:0002347	response to tumor cell	5.88	[Hspd1]	0.0143
GO:0006458	'de novo' protein folding	5.88	[Hspa8]	0.0143
GO:0032733	positive regulation of interleukin-10 production	5.88	[Hspd1]	0.0143
GO:0000413	protein peptidyl-prolyl isomerization	5.56	[Ppia]	0.0143
GO:0002755	MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	5.26	[Hspd1]	0.0143
GO:0006929	substrate-dependent cell migration	5.26	[Atp5b]	0.0143
GO:0035304	regulation of protein dephosphorylation	5.00	[Ywhae]	0.0144
GO:0002833	positive regulation of response to biotic stimulus	5.00	[Hspd1]	0.0144
GO:0097345	mitochondrial outer membrane permeabilization	4.76	[Slc25a5]	0.0144
GO:0061077	chaperone-mediated protein folding	4.00	[Hspa8]	0.0151
GO:0035794	positive regulation of mitochondrial membrane permeability	4.00	[Slc25a5]	0.0151
GO:0006739	NADP metabolic process	4.17	[Tpi1]	0.0151
GO:0005753	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex	4.17	[Atp5b]	0.0151
GO:0032735	positive regulation of interleukin-12 production	4.17	[Hspd1]	0.0151
GO:0071353	cellular response to interleukin-4	4.35	[Tuba1b]	0.0151
GO:1902110	positive regulation of mitochondrial membrane permeability involved in apoptotic process	4.35	[Slc25a5]	0.0151
GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	4.35	[Atp5b]	0.0151
GO:0032481	positive regulation of type I interferon production	4.35	[Hspd1]	0.0151
GO:0015985	energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	4.35	[Atp5b]	0.0151
GO:0043030	regulation of macrophage activation	4.35	[Hspd1]	0.0151

---

\*% Genes associados: quanto os genes da lista representam (em %) o total de genes anotados para o termo associado.

**Tabela 8.** Termos enriquecidos para a lista de genes de *up vs down-regulated*, de acordo com anotação de **função molecular** do GO. A identificação e o nome do termo, a porcentagem e a identificação dos genes associados, a ontologia utilizada e o valor do p-value corrigido pelo teste de Benjamini-Hochberg para o termo indicado são apresentados.

GO ID	term name	% associated genes	associated genes	term <i>p</i> -value corrected with Benjamini-Hochberg
GO:0042288	MHC class I protein binding	22.22	[Atp5b, Tubb5]	0.0001
GO:0042287	MHC protein binding	14.29	[Atp5b, Tubb5]	0.0002
GO:0004807	triose-phosphate isomerase activity	100.00	[Tpi1]	0.0023
GO:0046554	malate dehydrogenase (NADP+) activity	100.00	[Mdh2]	0.0023
GO:0030060	L-malate dehydrogenase activity	50.00	[Mdh2]	0.0035
GO:0004743	pyruvate kinase activity	50.00	[Pkm2]	0.0035
GO:0050815	phosphoserine binding	25.00	[Ywhae]	0.0055
GO:0030955	potassium ion binding	14.29	[Pkm2]	0.0080
GO:0016615	malate dehydrogenase activity	14.29	[Mdh2]	0.0080
GO:0031420	alkali metal ion binding	10.00	[Pkm2]	0.0086
GO:0016861	intramolecular oxidoreductase activity, interconverting aldoses and ketoses	11.11	[Tpi1]	0.0089
GO:0001530	lipopolysaccharide binding	11.11	[Hspd1]	0.0089
GO:0046933	proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	11.11	[Atp5b]	0.0089
GO:0046961	proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	8.33	[Atp5b]	0.0092
GO:0044769	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, rotational mechanism	7.14	[Atp5b]	0.0096
GO:0045309	protein phosphorylated amino acid binding	4.76	[Ywhae]	0.0131
GO:0036442	hydrogen-exporting ATPase activity	4.76	[Atp5b]	0.0131

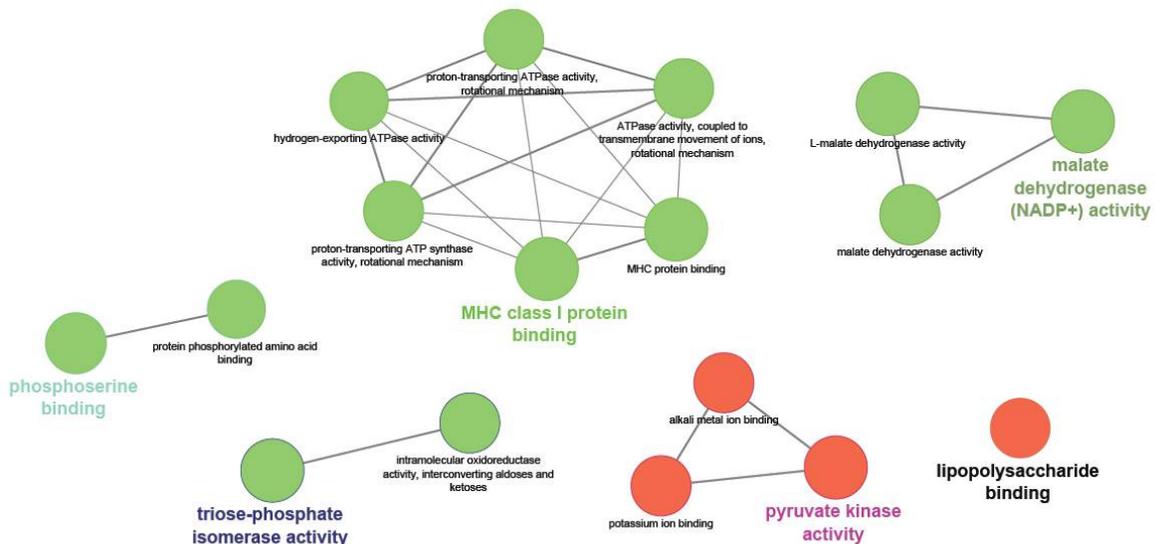
\*% *Genes associados*: quanto os genes da lista representam (em %) o total de genes anotados para o termo associado.

É importante observar que a análise foi realizada somente com as proteínas selecionadas com maior ou menor expressão de proteínas. Em função do pequeno número de proteínas selecionadas, os seguintes parâmetros foram adotados: **1.** Considerou-se um termo enriquecido quando encontrasse pelo menos **um** *gene name* associado ao termo e que esse *gene name* representasse ao menos 4% de todos os genes anotados para o termo. **2.** Foram também utilizados níveis mais baixos/ancestrais do GO, entre 3 e 8.

As tabelas apresentam termos anotados e que foram encontrados como enriquecidos para a lista de *gene name* inserida. É possível observar que alguns *gene name* apresentam mais de um termo anotado, por exemplo, os genes *Mdh2*, *Tpi1* (**Tabela 5**) e os genes *Atp5b*, *Tubb5* (**Tabela 6**). A análise de enriquecimento fornece um valor de significância do enriquecimento, o *p*-value e a tabela apresenta somente os termos com valores de *p* < 0,05.

Em resumo, as redes mostram em vermelho os termos anotados para os genes *up-regulated*, enquanto os termos em verde são referentes aos genes *down-regulated*. Os nodos representam os termos anotados e o gradiente de cor indica o grau de enriquecimento do termo no seu respectivo cluster, ou seja, quanto mais vermelho, maior foi o enriquecimento do termo no *cluster* 1, enquanto que, quanto mais próximo do verde, maior foi o enriquecimento no *cluster* 2. Dessa forma, a cor branca (presente no termo *mitochondrial nucleoid*) indica que genes de ambos os *clusters* foram identificados no termo, não havendo maior enriquecimento em um ou outro *cluster* de genes.

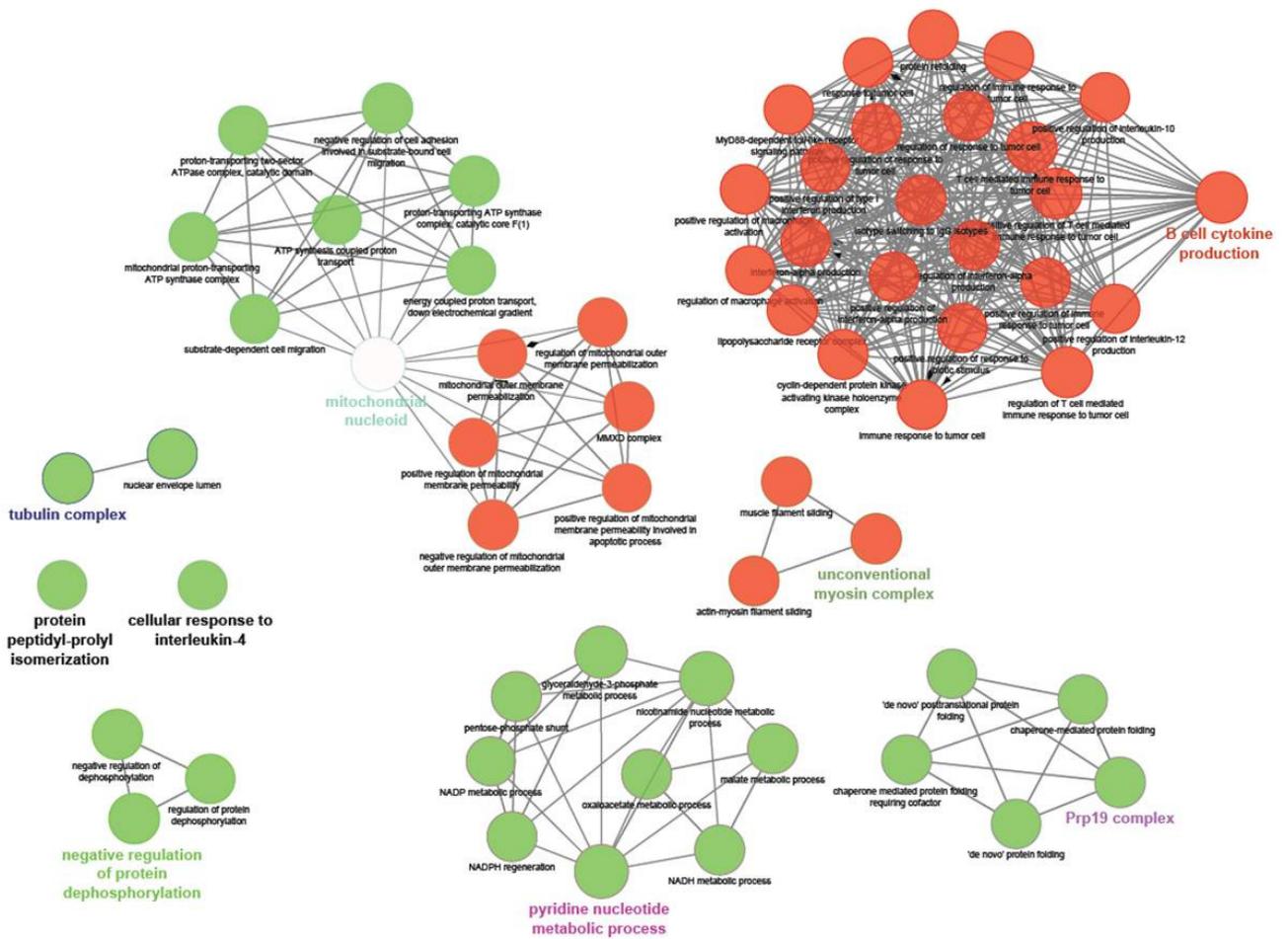
Na **Fig. 8** podemos encontrar as seguintes redes funcionais: **1- phosphoserine binding:** *protein phosphorylated amino acid binding*. **2- triose-phosphate isomerase activity:** *intramolecular oxidoreductase activity e interconverting aldoses and ketoses*. **3- MHC class I protein binding:** *MHC protein binding, hydrogen-exporting ATPase activity, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism, ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, rotational mechanism, proton-transporting ATPase activity e rotational mechanism*. **4- lipopolysaccharide binding**. **5- pyruvate kinase activity:** *alkali metal ion binding e potassium ion binding*. **6- malate dehydrogenase (NADP+) activity:** *L-malate dehydrogenase activity e malate dehydrogenase activity*.



**Fig. 8.** Rede de categorias funcionais de proteínas diferencialmente expressas nas condições após os tratamentos com os inibidores de FASN. Proteínas foram agrupadas de acordo com termos de função molecular do GO usando o plugin ClueGO do Cytoscape. São exibidos termos funcionais do GO para proteínas *up-regulated* (nodos em vermelho) e para proteínas *down-regulated* (nodos em verde).

Na **Fig. 9** podemos encontrar as seguintes redes funcionais nos processos biológicos: **1- B cell cytokine production:** *positive regulation of T cell, mediated immune response to tumor cell, positive regulation of response to biotic stimulus, positive regulation of interleukin-12 production, regulation of interferon-alpha production, regulation of T cell mediated immune response to tumor cell, T cell mediated immune response to tumor cell, protein refolding, positive regulation of interleukin-10 production, response to tumor cell, MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway, positive regulation of response to tumor cell, regulation of immune response to tumor cell, regulation of response to tumor cell, isotype switching to IgG isotypes, positive regulation*

*of interferon-alpha production, positive regulation of type I interferon production, positive regulation of macrophage activation, interferon-alpha production, regulation of macrophage activation, lipopolysaccharide receptor complex, cyclin-dependent protein kinase activating kinase holoenzyme complex immune response to tumor cell.*
**2- nuclear envelope lumen:** *tubulin complex, protein peptidyl-prolyl isomerization e cellular response to interleukin-4.*
**3- negative regulation of protein dephosphorylation:** *negative regulation of dephosphorylation e regulation of protein dephosphorylation.*
**4- Prp19 complex:** *chaperone mediated protein folding requiring cofactor, chaperone-mediated protein folding, 'de novo' posttranslational protein folding, e 'de novo' protein folding.*
**5- pyridine nucleotide metabolic process:** *glyceraldehyde-3-phosphate metabolic process, NADPH regeneration, NADP metabolic process, pentose-phosphate shunt, malate metabolic process, nicotinamide nucleotide metabolic process, oxaloacetate metabolic process e NADH metabolic process.*
**6- mitochondrial nucleoid:** *negative regulation of cell adhesion involved in substrate-bound cell migration, proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), energy coupled proton transport, down electrochemical gradient, proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain, mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, substrate-dependent cell migration, ATP synthesis coupled proton transport, positive regulation of mitochondrial membrane permeability involved in apoptotic process, positive regulation of mitochondrial membrane permeability, MMXD complex, regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization, mitochondrial outer membrane permeabilization e negative regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization.*
**7- unconventional myosin complex:** *actin-myosin filament sliding e muscle filament sliding.*



**Fig. 9.** Rede de categorias funcionais de proteínas diferencialmente expressas nas condições após os tratamentos com os inibidores de FASN. Proteínas foram agrupadas de acordo com termos de processos biológicos e componentes celulares do GO usando o plugin ClueGO do Cytoscape. São exibidos termos funcionais do GO para proteínas *up-regulated* (nodos em vermelho) e para proteínas *down-regulated* (nodos em verde). Nodos em branco indicam que proteínas de ambas as categorias (*up* e *down-regulated*) foram identificadas no mesmo termo.

A análise das proteínas identificadas em frações mitocondriais enriquecidas de células melan-a após os tratamentos com os inibidores de FASN cerulenina e orlistat, indicam que a diminuição da expressão de MDH2 está associada a importantes alterações em termos que estão enriquecidos, dos quais são extremamente interligados com a produção de energia e funcionamento da mitocôndria, tais como *ATP synthesis coupled proton transport* (GO:0015986), *NADH metabolic process*, *malate metabolic process*, *nicotinamide nucleotide metabolic process*, *oxaloacetate metabolic process*. De fato, nossos resultados demonstrados no **Capítulo I** mostram que a cerulenina e orlistat inibem a respiração dessas células, e essas alterações demonstram de que maneira estes agentes inibem a respiração mitocondrial.

Outro aspecto importante refere-se ao aumento da expressão de HSP60, que está intimamente associada aos termos enriquecidos encontrados nos nodos da **Fig. 9. B cell cytokine production e mitochondrial nucleoid** concordam com estudos que a HSP60 por si só pode causar inflamação e apoptose (Kobba, Kim *et al.*, 2011) e evidencia que, tanto o tratamento com cerulenina quanto com orlistat induzem aumento das proteínas *Heat shock* nas células melan-a, indicando a sua participação no processo de indução da apoptose.

Nossos resultados demonstram, em conjunto, que os inibidores de FASN cerulenina e orlistat induzem alterações em diversas vias metabólicas e processos biológicos mitocondriais relacionados com a indução da morte celular nas células melan-a.



## ***CONCLUSÕES***

---



1. Os inibidores de FASN cerulenina e orlistat induzem morte de melanócitos não tumorigênicos, células melan-a, através da ativação da via intrínseca da apoptose, com ativação de caspase-3, -9 e liberação de citocromo c.
2. Cerulenina e orlistat reduzem a proliferação das células melan-a, com consequente acúmulo de células nas fases G0/G1 do ciclo, confirmado pelo acúmulo da proteína supressora de tumor p21<sup>WAF/Cip</sup>.
3. A apoptose induzida pelos inibidores de FASN em melan a é mediada por uma disfunção mitocondrial, inibição da respiração nos complexos I e II, bem como pelo aumento de espécies reativas de oxigênio. A adição do antioxidante NAC protege as células contra a morte por apoptose.
4. O tratamento com cerulenina ou orlistat não alterou o conteúdo de ácidos graxos livres presentes nas mitocôndrias das células melan-a, indicando que os inibidores de FASN agem nestas células por um mecanismo independente da ação desta enzima.
5. O tratamento com cerulenina ou orlistat elevou os níveis da “heat shock protein” HSP60 e do translocador de nucleotídeo de adenina ANT2, assim como reduziu os níveis da malato desidrogenase MDH2 em mitocôndrias isoladas de células melan-a tratadas, quando comparadas aos seus respectivos controles, sugerindo alterações nas vias de regulação do metabolismo mitocondrial associados ao estresse oxidativo.
6. Em conjunto, nossos dados sugerem que cerulenina e orlistat induzem apoptose em células não tumorais como resultado de uma disfunção mitocondrial e de maneira independente de FASN.



## *Referências Bibliográficas*

---



- Agostini, M., S. D. Silva, *et al.* Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. Oral Oncol, v.40, n.7, Aug, p.728-35. 2004.
- Alirol, E. e J. C. Martinou. Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? Oncogene, v.25, n.34, Aug 7, p.4706-16. 2006.
- Almeida, J. P., R. D. Coletta, *et al.* Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. J Periodontol, v.76, n.2, Feb, p.272-8. 2005.
- Alo, P. L., P. Visca, *et al.* Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. Oncol Rep, v.7, n.6, Nov-Dec, p.1383-8. 2000.
- Ashburner, M., C. A. Ball, *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet, v.25, n.1, May, p.25-9. 2000.
- Baines, C. P., R. A. Kaiser, *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature, v.434, n.7033, Mar 31, p.658-62. 2005.
- Bandyopadhyay, S., R. Zhan, *et al.* Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. Cancer Res, v.66, n.11, Jun 1, p.5934-40. 2006.
- Baron, A., T. Migita, *et al.* Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? J Cell Biochem, v.91, n.1, Jan 1, p.47-53. 2004.
- Beltran, B., A. Mathur, *et al.* The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.26, Dec 19, p.14602-7. 2000.
- Bennett, D. C., P. J. Cooper, *et al.* A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. Int J Cancer, v.39, n.3, Mar 15, p.414-8. 1987.
- Beutner, G., A. Ruck, *et al.* Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. Biochim Biophys Acta, v.1368, n.1, Jan 5, p.7-18. 1998.
- Bindea, G., B. Mlecnik, *et al.* ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics, v.25, n.8, Apr 15, p.1091-3. 2009.
- Bligh, E. G. e W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol, v.37, n.8, Aug, p.911-7. 1959.

- Boveris, A. e B. Chance. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J, v.134, n.3, Jul, p.707-16. 1973.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- Brand, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. Exp Gerontol, v.45, n.7-8, Aug, p.466-72. 2010.
- Brdiczka, D., G. Beutner, *et al.* The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. Biofactors, v.8, n.3-4, p.235-42. 1998.
- Briggs, M. R., C. Yokoyama, *et al.* Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. J Biol Chem, v.268, n.19, Jul 5, p.14490-6. 1993.
- Brink, J., S. J. Ludtke, *et al.* Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.1, Jan 8, p.138-43. 2002.
- Brown, M. S. e J. L. Goldstein. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell, v.89, n.3, May 2, p.331-40. 1997.
- Brown, M. S. e J. L. Goldstein. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.20, Sep 28, p.11041-8. 1999.
- Browne, C. D., E. J. Hindmarsh, *et al.* Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. Faseb J, v.20, n.12, Oct, p.2027-35. 2006.
- Budihardjo, I., H. Oliver, *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol, v.15, p.269-90. 1999.
- Campos, C. B., B. A. Paim, *et al.* Method for monitoring of mitochondrial cytochrome c release during cell death: Immunodetection of cytochrome c by flow cytometry after selective permeabilization of the plasma membrane. Cytometry A, v.69, n.6, Jun, p.515-23. 2006.
- Carvalho, M. A., K. G. Zecchin, *et al.* Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. Int J Cancer, v.123, n.11, Dec 1, p.2557-65. 2008.

- Castilho, R. F., A. J. Kowaltowski, *et al.* The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. J Bioenerg Biomembr, v.28, n.6, Dec, p.523-9. 1996.
- Chajes, V., M. Cambot, *et al.* Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. Cancer Res, v.66, n.10, May 15, p.5287-94. 2006.
- Chen, J., S. Gamou, *et al.* Targeted in vivo delivery of therapeutic gene into experimental squamous cell carcinomas using anti-epidermal growth factor receptor antibody: immunogene approach. Hum Gene Ther, v.9, n.18, Dec 10, p.2673-81. 1998.
- Chirala, S. S., H. Chang, *et al.* Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.11, May 27, p.6358-63. 2003.
- Chirala, S. S., A. Jayakumar, *et al.* Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.6, Mar 13, p.3104-8. 2001.
- Coleman, M. L., E. A. Sahai, *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. Nat Cell Biol, v.3, n.4, Apr, p.339-45. 2001.
- Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J, v.341 ( Pt 2), Jul 15, p.233-49. 1999.
- D'erchia, A. M., A. Tullo, *et al.* The fatty acid synthase gene is a conserved p53 family target from worm to human. Cell Cycle, v.5, n.7, Apr, p.750-8. 2006.
- Dachs, G. U. e G. M. Tozer. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. Eur J Cancer, v.36, n.13 Spec No, Aug, p.1649-60. 2000.
- Datta, S. R., A. Brunet, *et al.* Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev, v.13, n.22, Nov 15, p.2905-27. 1999.
- De Schrijver, E., K. Brusselmans, *et al.* RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. Cancer Res, v.63, n.13, Jul 1, p.3799-804. 2003.
- Deepa, P. R., S. Vandhana, *et al.* Therapeutic and toxicologic evaluation of anti-lipogenic agents in cancer cells compared with non-neoplastic cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol, v.110, n.6, Jun, p.494-503. 2012.

- Di Lisa, F. e P. Bernardi. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. Mol Cell Biochem, v.184, n.1-2, Jul, p.379-91. 1998.
- Dowling, S., J. Cox, *et al.* Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. Lipids, v.44, n.6, Jun, p.489-98. 2009.
- Du, C., M. Fang, *et al.* Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell, v.102, n.1, Jul 7, p.33-42. 2000.
- Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol, v.35, n.4, p.495-516. 2007.
- Enari, M., H. Sakahira, *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature, v.391, n.6662, Jan 1, p.43-50. 1998.
- Epstein, J. I., M. Carmichael, *et al.* OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. Urology, v.45, n.1, Jan, p.81-6. 1995.
- Fagian, M. M., L. Pereira-Da-Silva, *et al.* Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants. J Biol Chem, v.265, n.32, Nov 15, p.19955-60. 1990.
- Fiers, W., R. Beyaert, *et al.* More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. Oncogene, v.18, n.54, Dec 16, p.7719-30. 1999.
- Figueira, T. R., M. H. Barros, *et al.* Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. Antioxid Redox Signal, v.18, n.16, Jun 1, p.2029-74. 2013.
- Figueira, T. R., R. F. Castilho, *et al.* The higher susceptibility of congenital analbuminemic rats to Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition is associated with the increased expression of cyclophilin D and nitrosothiol depletion. Mol Genet Metab, v.104, n.4, Dec, p.521-8. 2011.
- Flavin, R., S. Peluso, *et al.* Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. Future Oncol, v.6, n.4, Apr, p.551-62. 2010.
- Foretz, M., C. Guichard, *et al.* Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.22, Oct 26, p.12737-42. 1999.
- Fritz, V., Z. Benfodda, *et al.* Metabolic intervention on lipid synthesis converging pathways abrogates prostate cancer growth. Oncogene, v.32, n.42, Oct 17, p.5101-10. 2013.

- Fukuda, H., N. Iritani, *et al.* Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene by insulin/glucose, polyunsaturated fatty acid and leptin in hepatocytes and adipocytes in normal and genetically obese rats. Eur J Biochem, v.260, n.2, Mar, p.505-11. 1999.
- Furuta, E., S. K. Pai, *et al.* Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. Cancer Res, v.68, n.4, Feb 15, p.1003-11. 2008.
- Furuya, Y., S. Akimoto, *et al.* Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. Anticancer Res, v.17, n.6D, Nov-Dec, p.4589-93. 1997.
- Gansler, T. S., W. Hardman, 3rd, *et al.* Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. Hum Pathol, v.28, n.6, Jun, p.686-92. 1997.
- Garrido, C., L. Galluzzi, *et al.* Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ, v.13, n.9, Sep, p.1423-33. 2006.
- Goping, I. S., M. Barry, *et al.* Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. Immunity, v.18, n.3, Mar, p.355-65. 2003.
- Goward, C. R. e D. J. Nicholls. Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. Protein Sci, v.3, n.10, Oct, p.1883-8. 1994.
- Green, D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. Cell, v.121, n.5, Jun 3, p.671-4. 2005.
- Green, D. R. e G. Kroemer. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science, v.305, n.5684, Jul 30, p.626-9. 2004.
- Green, D. R. e J. C. Reed. Mitochondria and apoptosis. Science, v.281, n.5381, Aug 28, p.1309-12. 1998.
- Gross, A., J. M. McDonnell, *et al.* BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev, v.13, n.15, Aug 1, p.1899-911. 1999.
- Guerciolini, R. Mode of action of orlistat. Int J Obes Relat Metab Disord, v.21 Suppl 3, Jun, p.S12-23. 1997.
- Gunter, T. E., D. I. Yule, *et al.* Calcium and mitochondria. FEBS Lett, v.567, n.1, Jun 1, p.96-102. 2004.
- Gupta, S. e A. A. Knowlton. HSP60, Bax, apoptosis and the heart. J Cell Mol Med, v.9, n.1, Jan-Mar, p.51-8. 2005.

- Halestrap, A. P., G. P. Mcstay, *et al.* The permeability transition pore complex: another view. Biochimie, v.84, n.2-3, Feb-Mar, p.153-66. 2002.
- Halliwell, B. e J. M. Gutteridge. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. FEBS Lett, v.307, n.1, Jul 27, p.108-12. 1992.
- Hansson, M. J., S. Morota, *et al.* Cyclophilin D-sensitive mitochondrial permeability transition in adult human brain and liver mitochondria. J Neurotrauma, v.28, n.1, Jan, p.143-53. 2011.
- Hata, T., Y. Sano, *et al.* Study of new antifungal antibiotic. Jpn. J. Bacteriol, v.15, p.1075-1077. 1960.
- Heemers, H., B. Maes, *et al.* Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. Mol Endocrinol, v.15, n.10, Oct, p.1817-28. 2001.
- Heiligtag, S. J., R. Bredehorst, *et al.* Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. Cell Death Differ, v.9, n.9, Sep, p.1017-25. 2002.
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. Nature, v.407, n.6805, Oct 12, p.770-6. 2000.
- Hightower, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. Cell, v.66, n.2, Jul 26, p.191-7. 1991.
- Horton, J. D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. Biochem Soc Trans, v.30, n.Pt 6, Nov, p.1091-5. 2002.
- Huang, G., A. E. Vercesi, *et al.* Essential regulation of cell bioenergetics in Trypanosoma brucei by the mitochondrial calcium uniporter. Nat Commun, v.4, Dec 5, p.2865. 2013.
- Hunter, D. R., R. A. Haworth, *et al.* Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. J Biol Chem, v.251, n.16, Aug 25, p.5069-77. 1976.
- Igney, F. H. e P. H. Krammer. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer, v.2, n.4, Apr, p.277-88. 2002.
- Innocenzi, D., P. L. Alo, *et al.* Fatty acid synthase expression in melanoma. J Cutan Pathol, v.30, n.1, Jan, p.23-8. 2003.

- Jackowski, S., J. Wang, *et al.* Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells. Biochim Biophys Acta, v.1483, n.3, Jan 31, p.301-15. 2000.
- Jayakumar, A., M. H. Tai, *et al.* Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.19, Sep 12, p.8695-9. 1995.
- Johansson, P., B. Wiltschi, *et al.* Inhibition of the fungal fatty acid synthase type I multienzyme complex. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.35, Sep 2, p.12803-8. 2008.
- Joza, N., S. A. Susin, *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature, v.410, n.6828, Mar 29, p.549-54. 2001.
- Kadenbach, B., S. Arnold, *et al.* The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. Biochim Biophys Acta, v.1655, n.1-3, Apr 12, p.400-8. 2004.
- Kapur, P., D. Rakheja, *et al.* Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. Mod Pathol, v.18, n.8, Aug, p.1107-12. 2005.
- Kearney, K. E., T. G. Pretlow, *et al.* Increased expression of fatty acid synthase in human aberrant crypt foci: possible target for colorectal cancer prevention. Int J Cancer, v.125, n.1, Jul 1, p.249-52. 2009.
- Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. EMBO Rep, v.2, n.4, Apr, p.282-6. 2001.
- Klingenberg, M. e D. R. Nelson. Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier. Biochim Biophys Acta, v.1187, n.2, Aug 30, p.241-4. 1994.
- Knowles, L. M., F. Axelrod, *et al.* A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. J Biol Chem, v.279, n.29, Jul 16, p.30540-5. 2004.
- Kobba, S., S. C. Kim, *et al.* The heat shock paradox and cardiac myocytes: role of heat shock factor. Shock, v.35, n.5, May, p.478-84. 2011.
- Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, *et al.* The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. Nature, v.427, n.6973, Jan 29, p.461-5. 2004.
- Kothakota, S., T. Azuma, *et al.* Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science, v.278, n.5336, Oct 10, p.294-8. 1997.
- Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, *et al.* Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca<sup>2+</sup> ions. A

- proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. J Biol Chem, v.271, n.6, Feb 9, p.2929-34. 1996.
- Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, *et al.* Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett, v.495, n.1-2, Apr 20, p.12-5. 2001.
- Kowaltowski, A. J., L. E. Netto, *et al.* The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. J Biol Chem, v.273, n.21, May 22, p.12766-9. 1998.
- Krauskopf, A., O. Eriksson, *et al.* Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. Biochim Biophys Acta, v.1757, n.5-6, May-Jun, p.590-5. 2006.
- Kridel, S. J., F. Axelrod, *et al.* Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. Cancer Res, v.64, n.6, Mar 15, p.2070-5. 2004.
- Kroemer, G., B. Dallaporta, *et al.* The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. Annu Rev Physiol, v.60, p.619-42. 1998.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ, v.16, n.1, Jan, p.3-11. 2009.
- Krontiras, H., G. D. Roye, *et al.* Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. Head Neck, v.21, n.4, Jul, p.325-9. 1999.
- Kuhajda, F. P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. Nutrition, v.16, n.3, Mar, p.202-8. 2000.
- Kuhajda, F. P., E. S. Pizer, *et al.* Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.7, Mar 28, p.3450-4. 2000.
- Kumar-Sinha, C., K. W. Ignatoski, *et al.* Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. Cancer Res, v.63, n.1, Jan 1, p.132-9. 2003.
- Kusakabe, T., A. Nashimoto, *et al.* Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. Histopathology, v.40, n.1, Jan, p.71-9. 2002.
- Lacasa, D., X. Le Liepvre, *et al.* Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. J Biol Chem, v.276, n.15, Apr 13, p.11512-6. 2001.

- Lakshmanan, M. R., C. M. Nepokroeff, *et al.* Control of the synthesis of fatty-acid synthetase in rat liver by insulin, glucagon, and adenosine 3':5' cyclic monophosphate. Proc Natl Acad Sci U S A, v.69, n.12, Dec, p.3516-9. 1972.
- Lal, A., H. Peters, *et al.* Transcriptional response to hypoxia in human tumors. J Natl Cancer Inst, v.93, n.17, Sep 5, p.1337-43. 2001.
- Larm, J. A., F. Vaillant, *et al.* Up-regulation of the plasma membrane oxidoreductase as a prerequisite for the viability of human Namalwa rho 0 cells. J Biol Chem, v.269, n.48, Dec 2, p.30097-100. 1994.
- Lemasters, J. J., A. L. Nieminen, *et al.* The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochim Biophys Acta, v.1366, n.1-2, Aug 10, p.177-96. 1998.
- Lemasters, J. J., T. P. Theruvath, *et al.* Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. Biochim Biophys Acta, v.1787, n.11, Nov, p.1395-401. 2009.
- Li, J. N., M. Gorospe, *et al.* Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. Cancer Res, v.61, n.4, Feb 15, p.1493-9. 2001.
- Liu, B., Y. Wang, *et al.* Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. Cancer Chemother Pharmacol, v.49, n.3, Mar, p.187-93. 2002.
- Liu, H., J. Y. Liu, *et al.* Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. Int J Biochem Mol Biol, v.1, n.1, Jul 18, p.69-89. 2010.
- Liu, Q., C. T. Harvey, *et al.* Malate dehydrogenase 2 confers docetaxel resistance via regulations of JNK signaling and oxidative metabolism. Prostate, v.73, n.10, Jul, p.1028-37. 2013.
- Liu, S. S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. Biosci Rep, v.17, n.3, Jun, p.259-72. 1997.
- Liu, X., C. N. Kim, *et al.* Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell, v.86, n.1, Jul 12, p.147-57. 1996.
- Liu, X., Y. Shi, *et al.* Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA-MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis. Mol Cancer Ther, v.5, n.3, Mar, p.494-501. 2006.

- Loiseau, D., A. Chevrollier, *et al.* Oxygen consumption and expression of the adenine nucleotide translocator in cells lacking mitochondrial DNA. Exp Cell Res, v.278, n.1, Aug 1, p.12-8. 2002.
- Lorenzo, H. K., S. A. Susin, *et al.* Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. Cell Death Differ, v.6, n.6, Jun, p.516-24. 1999.
- Lundberg, J. O. e E. Weitzberg. NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. Arch Pharm Res, v.32, n.8, Aug, p.1119-26. 2009.
- Lupu, R. e J. A. Menendez. Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators? Endocrinology, v.147, n.9, Sep, p.4056-66. 2006.
- Malik, R., K. Dulla, *et al.* From proteome lists to biological impact--tools and strategies for the analysis of large MS data sets. Proteomics, v.10, n.6, Mar, p.1270-83. 2010.
- Martel, P. M., C. M. Bingham, *et al.* S14 protein in breast cancer cells: direct evidence of regulation by SREBP-1c, superinduction with progestin, and effects on cell growth. Exp Cell Res, v.312, n.3, Feb 1, p.278-88. 2006.
- Martin, L. J. Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. Pharmaceuticals (Basel), v.3, n.4, p.839-915. 2010.
- Mashima, T., H. Seimiya, *et al.* De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. Br J Cancer, v.100, n.9, May 5, p.1369-72. 2009.
- Mcclintock, D. S., M. T. Santore, *et al.* Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. Mol Cell Biol, v.22, n.1, Jan, p.94-104. 2002.
- Mcconkey, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. Toxicol Lett, v.99, n.3, Nov 12, p.157-68. 1998.
- Menendez, J. A., R. Colomer, *et al.* Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? Med Hypotheses, v.64, n.2, p.342-9. 2005.
- Menendez, J. A. e R. Lupu. Mediterranean dietary traditions for the molecular treatment of human cancer: anti-oncogenic actions of the main olive oil's monounsaturated fatty acid oleic acid (18:1n-9). Curr Pharm Biotechnol, v.7, n.6, Dec, p.495-502. 2006.
- Menendez, J. A. e R. Lupu. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer, v.7, n.10, Oct, p.763-77. 2007.

- Menendez, J. A., R. Lupu, *et al.* Targeting fatty acid synthase: potential for therapeutic intervention in her-2/neu-overexpressing breast cancer. Drug News Perspect, v.18, n.6, Jul-Aug, p.375-85. 2005.
- Menendez, J. A., L. Vellon, *et al.* Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. Ann Oncol, v.16, n.8, Aug, p.1253-67. 2005a.
- Menendez, J. A., L. Vellon, *et al.* Orlistat: from antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB-2)-overexpressing gastrointestinal tumors? Exp Biol Med (Maywood), v.230, n.3, Mar, p.151-4. 2005b.
- Menendez, J. A., L. Vellon, *et al.* Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.29, Jul 20, p.10715-20. 2004.
- Milgram, L. Z., L. A. Witters, *et al.* Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. Clin Cancer Res, v.3, n.11, Nov, p.2115-20. 1997.
- Minowada, G. e W. J. Welch. Clinical implications of the stress response. J Clin Invest, v.95, n.1, Jan, p.3-12. 1995.
- Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, v.191, Jul 8, p.144-8. 1961.
- Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J, v.417, n.1, Jan 1, p.1-13. 2009.
- Naga, K. K., P. G. Sullivan, *et al.* High cyclophilin D content of synaptic mitochondria results in increased vulnerability to permeability transition. J Neurosci, v.27, n.28, Jul 11, p.7469-75. 2007.
- Nelson, L. D. e M. M. Cox. Lehninger princípios de bioquímica. v.1, p.975. 2002.
- Nemoto, T., S. Terashima, *et al.* Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. Pathobiology, v.69, n.6, p.297-303. 2001.
- Nepokroeff, C. M., M. R. Lakshmanan, *et al.* Coordinate control of rat liver lipogenic enzymes by insulin. Arch Biochem Biophys, v.162, n.2, Jun, p.340-4. 1974.
- Nguyen, T. T., M. V. Stevens, *et al.* Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. J Biol Chem, v.286, n.46, Nov 18, p.40184-92. 2011.

- Nicholls, D. G. e S. J. Ferguson. Proton current and respiratory control. in: *Bioenergetics*. p.69-75. 2002.
- Ogino, S., K. Nosho, *et al.* Cohort study of fatty acid synthase expression and patient survival in colon cancer. *J Clin Oncol*, v.26, n.35, Dec 10, p.5713-20. 2008.
- Oliveira, K. A., K. G. Zecchin, *et al.* Simvastatin inducing PC3 prostate cancer cell necrosis mediated by calcineurin and mitochondrial dysfunction. *J Bioenerg Biomembr*, v.40, n.4, Aug, p.307-14. 2008.
- Oliveras-Ferraros, C., A. Vazquez-Martin, *et al.* AMPK-sensed cellular energy state regulates the release of extracellular Fatty Acid Synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, v.378, n.3, Jan 16, p.488-93. 2009.
- Omura, S. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol Rev*, v.40, n.3, Sep, p.681-97. 1976.
- Ookhtens, M., R. Kannan, *et al.* Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *Am J Physiol*, v.247, n.1 Pt 2, Jul, p.R146-53. 1984.
- Paes Leme, A. F., C. M. Bellato, *et al.* Effects of sucrose on the extracellular matrix of plaque-like biofilm formed in vivo, studied by proteomic analysis. *Caries Res*, v.42, n.6, p.435-43. 2008.
- Pandey, P. R., H. Okuda, *et al.* Resveratrol suppresses growth of cancer stem-like cells by inhibiting fatty acid synthase. *Breast Cancer Res Treat*, v.130, n.2, Nov, p.387-98. 2011.
- Panneels, V., U. Schussler, *et al.* Choline head groups stabilize the matrix loop regions of the ATP/ADP carrier ScaAC2. *Biochem Biophys Res Commun*, v.300, n.1, Jan 3, p.65-74. 2003.
- Paulauskis, J. D. e H. S. Sul. Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J Biol Chem*, v.264, n.1, Jan 5, p.574-7. 1989.
- Payne, C. M., C. Weber, *et al.* Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis*, v.28, n.1, Jan, p.215-22. 2007.
- Pedersen, P. L. The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: an overview. *J Bioenerg Biomembr*, v.39, n.1, Feb, p.1-12. 2007.
- Pellegrino, M. W., A. M. Nargund, *et al.* Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta*, v.1833, n.2, Feb, p.410-6. 2013.

- Pemble, C. W. T., L. C. Johnson, *et al.* Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. Nat Struct Mol Biol, v.14, n.8, Aug, p.704-9. 2007.
- Petronilli, V., D. Penzo, *et al.* The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. J Biol Chem, v.276, n.15, Apr 13, p.12030-4. 2001.
- Piyathilake, C. J., A. R. Frost, *et al.* The expression of fatty acid synthase (FAS) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. Hum Pathol, v.31, n.9, Sep, p.1068-73. 2000.
- Pizer, E. S., F. J. Chrest, *et al.* Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. Cancer Res, v.58, n.20, Oct 15, p.4611-5. 1998.
- Pizer, E. S., C. Jackisch, *et al.* Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. Cancer Res, v.56, n.12, Jun 15, p.2745-7. 1996.
- Pizer, E. S., B. R. Pflug, *et al.* Increase fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen independent prostate cancer progression Proceedings of the American Association for Cancer Research, v.41, p.655. 2000.
- Pizer, E. S., J. Thupari, *et al.* Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. Cancer Res, v.60, n.2, Jan 15, p.213-8. 2000.
- Pizer, E. S., F. D. Wood, *et al.* Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. Cancer Res, v.56, n.6, Mar 15, p.1189-93. 1996.
- Polster, B. M. e G. Fiskum. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. J Neurochem, v.90, n.6, Sep, p.1281-9. 2004.
- Puig, T., J. Relat, *et al.* Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals. Anticancer Res, v.28, n.6A, Nov-Dec, p.3671-6. 2008.
- Puig, T., A. Vazquez-Martin, *et al.* Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75. Breast Cancer Res Treat, v.109, n.3, Jun, p.471-9. 2008.
- Rangan, V. S., A. K. Joshi, *et al.* Mapping the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation in vitro. Biochemistry, v.40, n.36, Sep 11, p.10792-9. 2001.

- Ravagnan, L., T. Roumier, *et al.* Mitochondria, the killer organelles and their weapons. J Cell Physiol, v.192, n.2, Aug, p.131-7. 2002.
- Reisch, A. S. e O. Elpeleg. Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc. Methods Cell Biol, v.80, p.199-222. 2007.
- Ricci, J. E., R. A. Gottlieb, *et al.* Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. J Cell Biol, v.160, n.1, Jan 6, p.65-75. 2003.
- Ricci, J. E., C. Munoz-Pinedo, *et al.* Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. Cell, v.117, n.6, Jun 11, p.773-86. 2004.
- Ronchi, J. A., T. R. Figueira, *et al.* A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. Free Radic Biol Med, v.63, Oct, p.446-56. 2013.
- Ronchi, J. A., A. E. Vercesi, *et al.* Reactive oxygen species and permeability transition pore in rat liver and kidney mitoplasts. J Bioenerg Biomembr, v.43, n.6, Dec, p.709-15. 2011.
- Ross, J. S., G. P. Linette, *et al.* Breast cancer biomarkers and molecular medicine. Expert Rev Mol Diagn, v.3, n.5, Sep, p.573-85. 2003.
- Rossi, M. R., S. Somji, *et al.* Expression of hsp 27, hsp 60, hsc 70, and hsp 70 stress response genes in cultured human urothelial cells (UROtsa) exposed to lethal and sublethal concentrations of sodium arsenite. Environ Health Perspect, v.110, n.12, Dec, p.1225-32. 2002.
- Rossi, S., E. Graner, *et al.* Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. Mol Cancer Res, v.1, n.10, Aug, p.707-15. 2003.
- Rossi, S., W. Ou, *et al.* Gastrointestinal stromal tumours overexpress fatty acid synthase. J Pathol, v.209, n.3, Jul, p.369-75. 2006.
- Rudel, T., F. T. Zenke, *et al.* p21-activated kinase (PAK) is required for Fas-induced JNK activation in Jurkat cells. J Immunol, v.160, n.1, Jan 1, p.7-11. 1998.
- Sahara, S., M. Aoto, *et al.* Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. Nature, v.401, n.6749, Sep 9, p.168-73. 1999.
- Saito, A. e R. F. Castilho. Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial permeability transition. Neurochem Res, v.35, n.11, Nov, p.1667-74. 2010.
- Saito, R., M. E. Smoot, *et al.* A travel guide to Cytoscape plugins. Nat Methods, v.9, n.11, Nov, p.1069-76. 2012.

- Samali, A., J. Cai, *et al.* Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. EMBO J, v.18, n.8, Apr 15, p.2040-8. 1999.
- Sato, Y., S. Nomura, *et al.* Studies on cerulenin, 3. Isolation and physico-chemical properties of cerulenin. J Antibiot (Tokyo), v.20, n.6, Nov, p.344-8. 1967.
- Scorrano, L. e S. J. Korsmeyer. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. Biochem Biophys Res Commun, v.304, n.3, May 9, p.437-44. 2003.
- Seagroves, T. N., H. E. Ryan, *et al.* Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. Mol Cell Biol, v.21, n.10, May, p.3436-44. 2001.
- Seguin, F., M. A. Carvalho, *et al.* The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. Br J Cancer, v.107, n.6, Sep 4, p.977-87. 2012.
- Semenza, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. Trends Mol Med, v.8, n.4 Suppl, p.S62-7. 2002.
- Shah, U. S., R. Dhir, *et al.* Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma. Hum Pathol, v.37, n.4, Apr, p.401-9. 2006.
- Silva, S. D., M. Agostini, *et al.* Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. Oral Oncol, v.40, n.7, Aug, p.688-96. 2004.
- Silva, S. D., I. W. Cunha, *et al.* Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. Virchows Arch, v.453, n.1, Jul, p.57-67. 2008.
- Simpson, D. A., S. Feeney, *et al.* Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. Mol Vis, v.6, Oct 5, p.178-83. 2000.
- Sirvent, P., S. Bordenave, *et al.* Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. Biochem Biophys Res Commun, v.338, n.3, Dec 23, p.1426-34. 2005.
- Smith, S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. Faseb J, v.8, n.15, Dec, p.1248-59. 1994.
- Smith, S., A. Witkowski, *et al.* Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. Prog Lipid Res, v.42, n.4, Jul, p.289-317. 2003.

- Smoot, M. E., K. Ono, *et al.* Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics, v.27, n.3, Feb 1, p.431-2. 2011.
- Stoops, J. K. e S. J. Wakil. Animal fatty acid synthetase. A novel arrangement of the beta-ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. J Biol Chem, v.256, n.10, May 25, p.5128-33. 1981.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, *et al.* Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. J Exp Med, v.189, n.2, Jan 18, p.381-94. 1999.
- Sutton, V. R., M. E. Wowk, *et al.* Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. Immunity, v.18, n.3, Mar, p.319-29. 2003.
- Suzuki, Y., Y. Imai, *et al.* A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. Mol Cell, v.8, n.3, Sep, p.613-21. 2001.
- Swinnen, J. V., M. Esquenet, *et al.* Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. Cancer Res, v.57, n.6, Mar 15, p.1086-90. 1997.
- Swinnen, J. V., H. Heemers, *et al.* Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. Oncogene, v.19, n.45, Oct 26, p.5173-81. 2000.
- Swinnen, J. V., T. Roskams, *et al.* Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. Int J Cancer, v.98, n.1, Mar 1, p.19-22. 2002.
- Takahashi, A., A. Masuda, *et al.* Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH<sub>m</sub>). Brain Res Bull, v.62, n.6, Feb 15, p.497-504. 2004.
- Takahiro, T., K. Shinichi, *et al.* Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. Clin Cancer Res, v.9, n.6, Jun, p.2204-12. 2003.
- Tsukamoto, Y., H. Wong, *et al.* The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. J Biol Chem, v.258, n.24, Dec 25, p.15312-22. 1983.
- Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol, v.552, n.Pt 2, Oct 15, p.335-44. 2003.
- Uchino, H., E. Elmer, *et al.* Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. Brain Res, v.812, n.1-2, Nov 23, p.216-26. 1998.

- Valle, V. G., M. M. Fagian, *et al.* The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. Arch Biochem Biophys, v.307, n.1, Nov 15, p.1-7. 1993.
- Van De Sande, T., E. De Schrijver, *et al.* Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. Cancer Res, v.62, n.3, Feb 1, p.642-6. 2002.
- Van Loo, G., P. Schotte, *et al.* Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. Cell Death Differ, v.8, n.12, Dec, p.1136-42. 2001.
- Vaseva, A. V., N. D. Marchenko, *et al.* p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. Cell, v.149, n.7, Jun 22, p.1536-48. 2012.
- Vercesi, A. E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca<sup>2+</sup> efflux from rat liver mitochondria. Arch Biochem Biophys, v.252, n.1, Jan, p.171-8. 1987.
- Vercesi, A. E. Mitocôndria ATP, calor e morte celular. Ciência Hoje, v.34, p.16-23. 2003.
- Vercesi, A. E., A. J. Kowaltowski, *et al.* Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. Front Biosci, v.11, p.2554-64. 2006.
- Vercesi, A. E., C. O. Rodrigues, *et al.* Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem, v.273, n.47, Nov 20, p.31040-7. 1998.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell, v.102, n.1, Jul 7, p.43-53. 2000.
- Visca, P., P. L. Alo, *et al.* Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. Clin Cancer Res, v.5, n.12, Dec, p.4111-8. 1999.
- Visca, P., V. Sebastiani, *et al.* Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. Anticancer Res, v.23, n.1A, Jan-Feb, p.335-9. 2003.
- Vlad, L. D., C. A. Axiotis, *et al.* Fatty Acid Synthase is Highly Expressed in Aggressive Thyroid Tumors. Mod. Pathol., v.12, p.70. 1999.
- Wakil, S. J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochemistry, v.28, n.11, May 30, p.4523-30. 1989.

- Wang, D. e H. S. Sul. Upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthase promoter. USF1 is regulated. J Biol Chem, v.270, n.48, Dec 1, p.28716-22. 1995.
- Wang, D. e H. S. Sul. Upstream stimulatory factor binding to the E-box at -65 is required for insulin regulation of the fatty acid synthase promoter. J Biol Chem, v.272, n.42, Oct 17, p.26367-74. 1997.
- Wang, X., M. R. Briggs, *et al.* Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. J Biol Chem, v.268, n.19, Jul 5, p.14497-504. 1993.
- Wang, X. e W. Tian. Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase. Biochem Biophys Res Commun, v.288, n.5, Nov 16, p.1200-6. 2001.
- Weiss, L., G. E. Hoffmann, *et al.* Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. Biol Chem Hoppe Seyler, v.367, n.9, Sep, p.905-12. 1986.
- Welch, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol Rev, v.72, n.4, Oct, p.1063-81. 1992.
- Westphal, S. e H. Kalthoff. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. Mol Cancer, v.2, Jan 7, p.6. 2003.
- Whelan, S. P. e B. S. Zuckerbraun. Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between. Oxid Med Cell Longev, v.2013, p.351613. 2013.
- Wilkins, J. C., D. Beighton, *et al.* Effect of acidic pH on expression of surface-associated proteins of *Streptococcus oralis*. Appl Environ Microbiol, v.69, n.9, Sep, p.5290-6. 2003.
- Wilkins, J. C., K. A. Homer, *et al.* Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions. Appl Environ Microbiol, v.68, n.5, May, p.2382-90. 2002.
- Xia, J., R. Mandal, *et al.* MetaboAnalyst 2.0--a comprehensive server for metabolomic data analysis. Nucleic Acids Res, v.40, n.Web Server issue, Jul, p.W127-33. 2009.
- Xia, J., N. Psychogios, *et al.* MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. Nucleic Acids Res, v.37, n.Web Server issue, Jul, p.W652-60. 2009.

- Xiao, R., Y. Su, *et al.* Dietary soy protein inhibits DNA damage and cell survival of colon epithelial cells through attenuated expression of fatty acid synthase. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.294, n.4, Apr, p.G868-76. 2008.
- Yarden, Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. Oncology, v.61 Suppl 2, p.1-13. 2001.
- Yoshida, H. The role of Apaf-1 in programmed cell death: from worm to tumor. Cell Struct Funct, v.28, n.1, Feb, p.3-9. 2003.
- Zamzami, N., P. Marchetti, *et al.* Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J Exp Med, v.181, n.5, May 1, p.1661-72. 1995.
- Zamzami, N., S. A. Susin, *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. J Exp Med, v.183, n.4, Apr 1, p.1533-44. 1996.
- Zecchin, K. G., L. C. Alberici, *et al.* Visualizing inhibition of fatty acid synthase through mass spectrometric analysis of mitochondria from melanoma cells. Rapid Commun Mass Spectrom, v.25, n.3, Feb 15, p.449-52. 2011.
- Zecchin, K. G., N. M. Inada, *et al.* Mitochondrial oxidative stress and permeability transition: Tumor cell death, immune response and dyslipidemias. Free Radical Pathophysiology, p.207-222. 2008.
- Zecchin, K. G., M. C. Pereira, *et al.* Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. Calcif Tissue Int, v.76, n.2, Feb, p.136-45. 2005.
- Zecchin, K. G., F. A. Rossato, *et al.* Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. Lab Invest, v.91, n.2, Aug 30, p.232-40. 2010.
- Zecchin, K. G., A. L. Seidinger, *et al.* High Bcl-2/Bax ratio in Walker tumor cells protects mitochondria but does not prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via calcineurin pathways. J Bioenerg Biomembr, v.39, n.2, Apr, p.186-94. 2007.
- Zhang, Y., C. Guo, *et al.* A pilot study of fatty acid metabolism in oral squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg, v.34, n.1, Jan, p.78-81. 2005.
- Zhao, W., S. Kridel, *et al.* Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy. Br J Cancer, v.95, n.7, Oct 9, p.869-78. 2006.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, *et al.* The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther, v.92, n.1, Oct, p.57-70. 2001.
- Zoratti, M. e I. Szabo. The mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta, v.1241, n.2, Jul 17, p.139-76. 1995.



## *Anexos*

---





## DECLARAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP - CEUA/UNICAMP - esclarece que não há necessidade do projeto **EFEITOS DOS INIBIDORES DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE SOBRE APOPTOSE E CICLO CELULAR DE CÉLULAS NÃO TUMORIGÊNICAS**, de responsabilidade do Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi e Franco Aparecido Rossato, ser analisado por esta Comissão, tendo em vista que envolve pesquisas linhagem celular *melan-a*, derivada de melanoblasto de camundongo, cedidas pela Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis do Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP.

Os responsáveis declaram que neste trabalho em nenhum momento foi realizado experimentação utilizando animais.

Campinas, 10 de outubro de 2013

  
Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO  
Presidente da CEUA/UNICAMP