



ROSE MARA ORTEGA

***Análise dos mecanismos antiproliferativos decorrentes da
inibição farmacológica da enzima ácido graxo sintase em células
de melanoma murino B16-F10: resultados in vitro e in vivo***

PIRACICABA

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ROSE MARA ORTEGA

***Análise dos mecanismos antiproliferativos decorrentes da
inibição farmacológica da enzima ácido graxo sintase em células
de melanoma murino B16-F10: resultados in vitro e in vivo***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutora em Estomatopatologia na área de Estomatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Gottardello Zecchin

Co-Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida por Rose Mara Ortega e orientada pela Prof(a). Dr(a). Karina Gottardello Zecchin.

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Or8a Ortega, Rose Mara, 1974-
Análise dos mecanismos antiproliferativos decorrentes da inibição farmacológica da enzima ácido graxo sintase em células de melanoma murino B16-F10 : resultados *in vitro* e *in vivo* / Rose Mara Ortega. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Karina Gottardello Zecchin.

Coorientador: Edgard Graner.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ciclo celular. 2. Proliferação de células. 3. Melanoma. I. Zecchin, Karina Gottardello, 1978-. II. Graner, Edgard, 1968-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of antiproliferative mechanisms resulting from pharmacological inhibition of the enzyme fatty acid synthase in mouse B16-F10 melanoma cells

Palavras-chave em inglês:

Cell cycle

Cell proliferation

Melanoma

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Karina Gottardello Zecchin [Orientador]

Ana Carolina Fragoso Motta

Lays Martin Sobral

Roger Chammas

Silvia Vanessa Lourenço

Data de defesa: 28-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2014, considerou a candidata ROSE MARA ORTEGA aprovada.

Karina Zecchin

Profa. Dra. KARINA GOTTARDELLO ZECCHIN

R. Chammas

Prof. Dr. ROGER CHAMMAS

Silvia Vanessa Lourenço

Profa. Dra. SILVIA VANESSA LOURENÇO

Ana Carolina Frágoso Motta

Profa. Dra. ANA CAROLINA FRAGOSO MOTTA

Lays Martin Sobral

Profa. Dra. LAYS MARTIN SOBRAL

RESUMO

Ácido graxo sintase (FASN - *fatty acid synthase*, EC 2.3.1.85) é a enzima metabólica responsável pela síntese endógena do ácido graxo saturado palmitato, a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA. Diversos estudos mostram que, em contraste com a maioria das células normais, FASN é altamente expressa em vários tipos de neoplasias malignas humanas, tais como as de próstata, mama e melanoma sendo que, em alguns destes tumores, a alta expressão de FASN está associada a um pior prognóstico. A inibição da enzima FASN resulta em inibição da proliferação e induz morte celular em diversas neoplasias malignas. Recentemente demonstramos que, *in vitro*, a inibição específica da atividade de FASN em linhagem celular de melanoma murino, B16-F10, induz a via intrínseca da apoptose, com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3, assim como altera a composição dos ácidos graxos livres presentes nas mitocôndrias das células B16-F10. O objetivo deste trabalho foi investigar de que maneira a inibição farmacológica de FASN reduz a proliferação de células B16-F10, *in vitro* e *in vivo*, utilizando C75 como inibidor de FASN. O tratamento de células e animais com C75 reduziu significativamente a proliferação celular e induziu apoptose. Houve significativa redução de células na fase S do ciclo celular, com acúmulo de células de G0/G1, em comparação com os controles. Western blottings feitos a partir de extratos de células em cultura e de tumores intraperitoneais mostraram aumento de p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, redução de Skp2 e cdk2, sem mudanças nos níveis de cdk4, 6 e ciclina E após tratamento com C75. A especificidade destes resultados foi confirmada pela redução da atividade enzimática de FASN após tratamento com C75 e pelo silenciamento de FASN com RNAi. Efeito anti-tumoral de C75 foi sugerido pela formação de tumores subcutâneos de menor volume quando comparados aos tumores de animais controle. Nossos achados mostram que a proliferação de células de melanoma é dependente de FASN, e que sua inibição primeiramente altera os níveis de proteínas envolvidas na transição de G1 para S, para posteriormente induzir apoptose em células de melanoma B16-F10.

ABSTRACT

Fatty acid synthase (FASN) is the metabolic enzyme responsible for the endogenous synthesis of the saturated long-chain fatty acid palmitate, from the precursors acetyl-CoA and malonyl-CoA. In contrast to most normal cells, the overexpression of FASN in several human malignancies, such as those of prostate, breast, ovary, melanoma, and soft tissue sarcomas has been associated with poor prognosis. FASN inhibition reduces cell proliferation by blocking DNA replication during S-phase, and induces apoptosis in several malignant neoplasias. We have previously shown that the specific inhibition of FASN activity significantly reduce proliferation and promote apoptosis, as demonstrated by the cytochrome c release and caspase-9 and -3 activation, as well as induces significant changes in the free fatty acids composition of B16-F10 cells mitochondria. Here we investigated the events involved in cell cycle arrest subsequent to FASN inhibition with C75. C75 treatment significantly reduced melanoma cells proliferation and induced apoptosis *in vitro* and in mice. Cell cycle arrest after C75 treatment was evidenced by a significant increase in G0/G1 phase, as well as decline of the S phase, in comparison with untreated cells. Western blotting analysis showed significant accumulations of the tumor suppressor proteins p21^{WAF1/Cip1} and p27^{Kip1}, together with decreased amounts of Skp2, essential for the proteasomal degradation of p27^{Kip1}, and cdk2, a Ser/Thr protein kinase necessary for the G1/S transition, in C75-treated cells or mice tumors. The levels of other proteins involved in G1/S cell cycle progression, such as cyclin E, cdk4, and cdk6 were not affected by FASN inhibition. These results were confirmed by inhibition of FASN activity after C75 treatment and by RNAi for FASN. Antitumoral effect of C75 was suggested by reduced subcutaneous tumors volume when compared to controls mice. Our results suggest that melanoma murine B16-F10 cells proliferation is dependent on FASN activity, and its inhibition first modify the levels of some proteins involved in the transition G1→S of cell cycle, to finally induce apoptosis in neoplastic cells.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	XIII
AGRADECIMENTOS	XVII
EPÍGRAFE	XIX
LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS	XXI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Ácido graxo sintase (FASN)	3
2.1.1 Regulação da expressão de FASN	6
2.1.2 Inibidores específicos da atividade de FASN	8
2.1.3 Efeitos biológicos da inibição de FASN	9
2.2 Ciclo celular	11
2.2.1 Controle do ciclo celular	13
2.2.2 Regulação da transição de G1 para S em células normais e tumorais	15
2.3 Melanoma	21
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Cultura de células	25
4.2 Preparo do C75	26
4.3 Curva de proliferação	26
4.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT	27
4.5 Avaliação das taxas de apoptose	27
4.6 Análise do ciclo celular	28

4.7 Lipogênese	29
4.8 Modelo animal de melanoma	30
4.9 Western blotting	30
4.9.1 Obtenção dos extratos protéicos	30
4.9.2 Separação eletroforética de proteínas e Western blotting	31
4.10 Verificação das taxas de proliferação tumoral <i>in vivo</i>	33
4.11 Verificação das taxas de apoptose <i>in vivo</i>	34
4.12 Avaliação da formação e tamanho de tumores	34
4.13 Silenciamento de FASN	35
4.14 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXO I	93

DEDICATÓRIA

*À minha família. Meu pai **José Carlos Ortega**. A minha mãe **Antonima Martins Ortega**. A minhas irmãs **Tânia** e **Carla**. Aos meus sobrinhos **Luca, Caio** e **Ana Carolina**. Vocês são o alicerce sobre o qual eu ainda sou construída, vocês pertencem à minha história e em vocês está o meu olhar para o futuro!*

A minha orientadora **Professora Dra. Karina Gottardello Zecchin**

e ao meu co-orientador **Professor Dr. Edgard Graner**

Meu sincero agradecimento pela oportunidade.

Meu sincero agradecimento pela dedicação.

Meu sincero agradecimento pela confiança.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio de muitas pessoas dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**;

Ao **Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

À **FAPESP**, pela concessão da bolsa de Doutorado (**processo 2010/52635-1**), e pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos através do Doutorado sanduíche graças à renovação de minha bolsa;

Ao **Prof. Dr. Edgard Graner**, pela co-orientação direta em minha pesquisa;

Ao **Prof. Dr. Anibal Vercesi**, por ter permitido que eu participasse das atividades no Laboratório de Bioenergética da FCM-UNICAMP;

Às **Prof. Dra. Helena C.F. Oliveira** e sua aluna de doutorado **Helena F. Raposo**, do Laboratório de Lípidos do IB-UNICAMP, pela colaboração nos experimentos de lipogênese;

Ao **Prof. Dr. Maximo Loda**, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório no DFCI em Boston (MA) e aos amigos Débora, Cornélia, Laura, Giórgia e Stefano;

Aos amigos do laboratório em Campinas Franco e Rute;

Aos amigos do laboratório de Piracicaba Andréia, Andréia Silva, Camilla, Débora, Elizabete, Estevão, Fernanda, Luciana, Márcia, Priscila, Marco, Michelle, Renato, Sibebe;

Aos demais amigos de pós-graduação Ana Lúcia, Alicia, Felipe, Katia, Lara, Lucas, Marcondes, Marissol, Rarin, Rogério, Sabrina e Wilfredo;

Aos demais funcionários do laboratório de patologia Adriano, Fabiana, Geovania, João e Luana;

Por fim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

EPÍGRAFE

“Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”

Cora Coralina

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP: *Acyl carrier protein*

ATCC: *American Type Culture Collection*

Cdk: *Cyclin-Dependent Kinase*

Cip: *Cyclin-dependent kinase Interacting Protein*

DMSO: *Dimetilsulfóxido*

DTT: *1,4-Dithiothreitol*

EGF: *Epidermal Growth Factor*

ErbB2: *Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*

FASN: *Fatty Acid Synthase*

G0: *Gap 0* - Intervalo 0 (estado de quiescência da célula)

G1: *Gap 1* - Intervalo 1

G2: *Gap 2* - Intervalo 2

Ink: *Inhibitor of Kinase*

kDa: *Quilodaltons*

Kip: *Kinase Inhibitor Protein*

M: *Mitose*

NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

PBS: *Solução salina tamponada com fosfato*

PI-3K/Akt: *Phosphatidylinositide 3-kinases*

S: *Fase S do ciclo celular*

SFB: *Soro Fetal Bovino*

SREBP: *Sterol Regulatory Element Binding Protein*

1 INTRODUÇÃO

O metabolismo desordenado em células neoplásicas é alvo de estudos há muitas décadas (Liu, 2010; Kuhajda, 2000). Em 1950, foi mostrado que o metabolismo dos lipídeos estava alterado em tecidos neoplásicos, mas até então acreditava-se que as células obtinham lipídeos pré-formados da dieta do hospedeiro (Medes, 1953). A constatação de que as células neoplásicas tem capacidade de sintetizar sua própria fonte de ácidos graxos paralelamente à atividade da enzima ácido graxo sintase (FASN) foi apresentada por Kuhajda na década de 1990. Adicionalmente, diversos autores demonstraram que a inibição da enzima FASN resulta em redução de proliferação e indução de morte celular em tumores de origens diversas (Kuhajada *et al.*, 1994; Pizer *et al.*, 1996a; 1996b; 1998; Furuya *et al.*, 1997; Kuhajada *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2004; 2005a). Desde então, FASN tem sido alvo de muitos estudos, sendo a literatura unânime em mostrar a alta expressão desta proteína e correlacionando-a com um pior prognóstico em inúmeras neoplasias, tais como em carcinomas de mama (Zhang *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008), cólon (Visca *et al.*, 1999; Ogino *et al.*, 2008 e 2009; Kearney *et al.*, 2009; Uddin *et al.*, 2009), próstata (Epstein *et al.*, 1995; Swinnen *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003; Van de Sande *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2006), ovário (Alo *et al.*, 2000), endométrio (Pizer *et al.*, 1998; Tsuji *et al.*, 2004), de células renais (Horiguchi *et al.*, 2008), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000; Orita *et al.*, 2007 e 2008), bexiga (Visca *et al.*, 2003), carcinomas espinocelulares bucais (CECs) (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004) e melanomas

(Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur, 2005), além de sarcomas de tecidos moles (Rossi *et al.*, 2006), mieloma múltiplo (Okawa *et al.*, 2008) e gliomas (Zhao *et al.*, 2006).

O ciclo celular trata-se de uma série de eventos coordenados através dos quais a célula duplica todo o seu conteúdo e se divide (Li *et al.*, 2006; Hochegger *et al.*, 2008). Sabe-se que para uma célula se dividir, a progressão através do ciclo envolve a ativação coordenada de proteínas, quinases dependentes de ciclinas (cdks), pela ligação com ciclinas específicas e, dessa maneira, diferentes complexos ciclinas/cdks operam durante as diferentes fases do ciclo celular (Carnero, 2002). Pontos de checagem previnem que a célula entre em uma fase até que tenha completado com sucesso a fase anterior (Malumbres e Barbacid, 2001). Na fase G1, por exemplo, no ponto de checagem, há o ponto de restrição, após o qual a célula está comprometida com o ciclo mesmo que os sinais mitogênicos sejam retirados (Alberts *et al.*, 2004). Desequilíbrios nestes controles podem levar a célula a uma proliferação descontrolada e possível crescimento neoplásico (Malumbres e Barbacid, 2001).

Considerando-se que grande parte dos ácidos graxos produzidos pelas células tumorais é incorporada aos fosfolípidos de membrana e que a biossíntese destes fosfolípidos é maior entre as fases G1 e S do ciclo celular, é de se esperar que a inibição de FASN culmine em acúmulo de células na fase G1, sugerindo forte associação entre o controle do ciclo e a atividade desta enzima (Menendez *et al.*, 2005b). Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da inibição de FASN com C75 sobre proliferação celular, apoptose e sobre algumas proteínas envolvidas na transição das fases G0/G1 para S do ciclo celular de células derivadas de melanoma murino B16-F10.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ácido graxo sintase (FASN)

Ácido graxo sintase (*fatty acid synthase* – FASN, EC 2.3.1.85) é a enzima metabólica responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa, mais especificamente o palmitato, a partir dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (**Fig. 1**) (Stoops e Wakil, 1981; Tsukamoto *et al.*, 1983; Kuhajda *et al.*, 2000; Chirala *et al.*, 2001; Ragan *et al.*, 2001; Baron *et al.*, 2004).

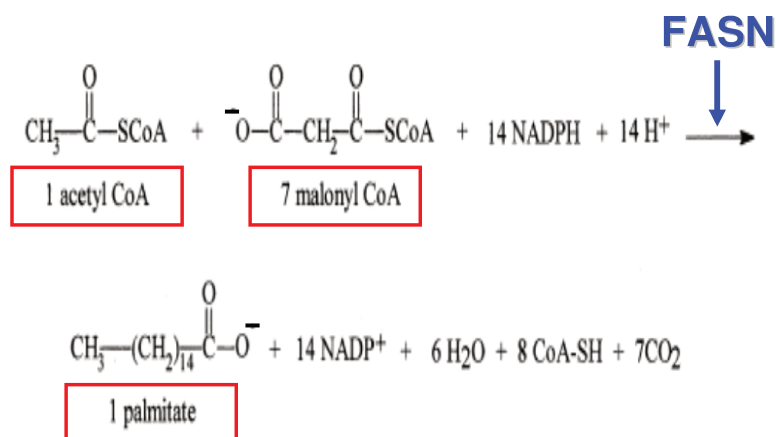


Fig. 1: Demonstração estequiométrica de FASN, onde apenas um único acetil-CoA é condensado com malonil-CoA pela enzima ácido graxo sintase, resultando na formação de uma cadeia de dois carbonos. Para a produção final de palmitato, a adição de seis moléculas de malonil-CoA na cadeia em crescimento se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

Modificado por Rose M. Ortega a partir de Kuhajda *et al.* (2000).

Estruturalmente, FASN é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas longas com massa molecular de aproximadamente 270 kDa e meia-vida de 12,2 h (Graner *et al.*, 2004). Esta enzima é formada por 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, de acordo com a seguinte ordem: β -cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transacilases, desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase, ACP e tioesterase (Fig. 2) (Wakil, 1989; Smith, 1994; Jayakumar *et al.*, 1995; Brink *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2005b).

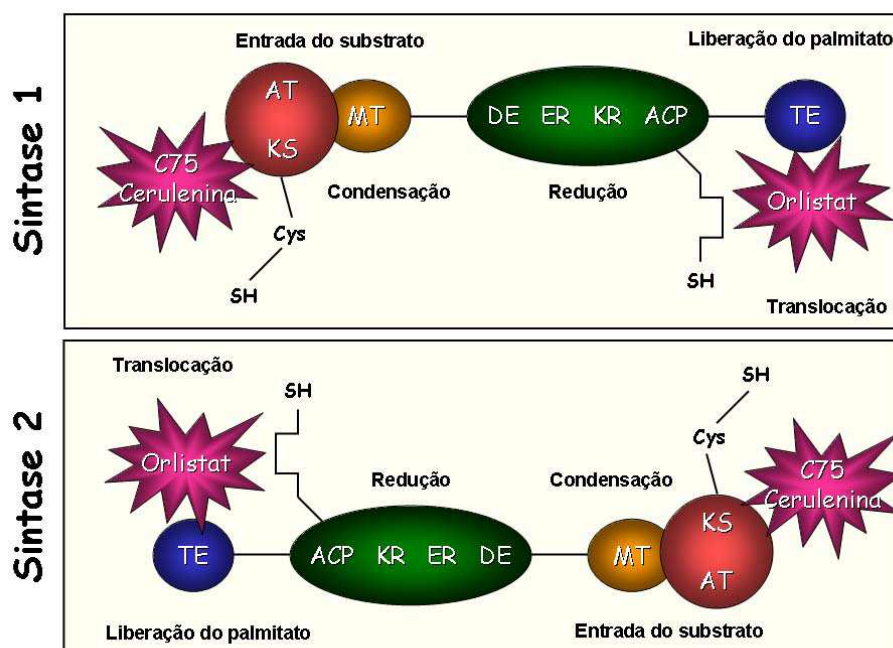


Fig. 2: Representação do complexo enzimático de FASN e seus sítios de inibição pelas drogas cerulenina, C75 e orlistat. Sítios de FASN: β -cetoacil sintase (KS – *ketoacyl synthase*), acetil-CoA (AT – *acetyl transferase*) e malonil-CoA transacilases (MT – *malonyl transferase*), desidratase (DE – *dehydratase*),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

A expressão de FASN é baixa ou até mesmo ausente em tecidos normais, exceto no fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões de recém-nascidos (Kuhajda *et al.*, 2000; Chirala *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002). A atividade desta enzima também é baixa na maioria dos tecidos normais, exceto os lipogênicos, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos usados pelas células provém da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Baron *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005a). Por outro lado, as células neoplásicas malignas utilizam ácidos graxos provenientes, em grande parte, da síntese endógena através de FASN e diversos são os tumores que apresentam aumento da atividade desta enzima: carcinoma de mama (Milgraum *et al.*, 1997), de ovário (Alo *et al.*, 2000), de próstata (Dhanasekaran *et al.*, 2001; Swinnen *et al.*, 2002; Dowling *et al.*, 2009), de endométrio (Pizer *et al.*, 1998), de tireóide (Vlad *et al.*, 1999), de pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000), de cólon (Visca *et al.*, 1999), de esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), de estômago (Kusakabe *et al.*, 2002; van de Sande *et al.*, 2005), de bexiga (Visca *et al.*, 2003), carcinoma espinocelular bucal (Krontiras *et al.*, 1999; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2008) e sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2006). Além disso, diversos trabalhos demonstraram que a alta expressão de FASN está associada a um pior prognóstico (Epstein *et al.*, 1995; Gansler *et al.*, 1997; Alo *et al.*, 2000; Kuhajda, 2000; Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2006; Menendez *et al.*, 2007). Em melanomas, por exemplo, observou-se que a alta expressão de FASN está associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástase e, conseqüentemente, pior prognóstico (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005). Tais achados são justificados pelo fato de FASN ter grande participação na formação de membranas celulares, uma vez que produz componentes como ácidos graxos e seus derivados (Chirala *et al.*, 2003), os quais também agem como

mensageiros intracelulares e como forma armazenadora de energia (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Desse modo, sua alta atividade proporciona vantagens para o rápido crescimento celular verificado nas neoplasias (Baron *et al.*, 2004).

2.1.1 Regulação da expressão de FASN

A expressão de FASN no fígado e tecido adiposo é regulada pela dieta, através de hormônios como a insulina, glucagon, glicocorticóides e hormônio tireoidiano T3 (Fukuda *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 potencial de estimular (insulina) ou inibir (leptina) a lipogênese dependente de FASN. 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 *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** (*sterol regulatory element binding protein*), 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 *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993). Em camundongos normais foi observado que os níveis dos mRNAs que codificam a síntese de ácidos graxos declinam após jejum e aumentam com uma dieta rica em carboidratos e pobre em gorduras (Shimomura *et al.*, 1999).

Em 1953 mostrou-se aumento da síntese de ácidos graxos em tecidos neoplásicos, em comparação com tecidos normais (Medes *et al.*, 1953). A partir da década de 1980, a regulação da expressão de FASN em tumores malignos começou a ser intensamente investigada, em linhagens celulares de câncer de mama (Chalbos *et al.*, 1987). Atualmente, muitos estudos mostram que, em células neoplásicas malignas, a maior parte dos ácidos graxos é proveniente da biossíntese endógena, de maneira praticamente independente da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Menendez *et al.*, 2005a).

Em tumores sensíveis a hormônios, estrógeno, progesterona e andrógenos desempenham um papel claro na regulação de FASN (Kuhajda, 2000). Progesterona estimula a expressão de FASN em linhagens celulares de câncer de mama (Lacasa *et al.*, 2001), enquanto andrógenos e fator de crescimento epidérmico (EGF) aumentam a expressão e a atividade FASN em linhagem celular de câncer de próstata (LNCaP) (Swinnen *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000; Swinnen *et al.*, 2000; Lacasa *et al.*, 2001). Esta regulação parece estar associada ao aumento da expressão de SREBP, cuja forma ativa estimula regiões regulatórias do gene que codifica FASN (Swinnen *et al.*, 1997b; 2000; Heemers *et al.*, 2001). Através da via de sinalização celular **PI-3K/Akt**, a oncoproteína **ErbB2** atua sobre o promotor de FASN, induzindo a síntese de ácidos graxos (Kumar-Sinha *et al.*, 2003), sendo que uma alta expressão e/ou amplificação de ErbB2 está associada com um pior prognóstico para câncer de mama (Yarden, 2001; Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2003). Além disso, a freqüente perda de função do gene supressor de tumor **PTEN** pode ativar a via PI-3K/Akt e desempenhar um importante papel na regulação de FASN em células neoplásicas (van de Sande *et al.*, 2002).

2.1.2 Inibidores específicos da atividade de FASN

Diversos agentes foram descritos como inibidores de FASN, tais como cerulenina, C75, orlistat, triclosan e alguns polifenóis (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Kridel *et al.*, 2004; Lupu e Menendez, 2006). A **cerulenina** ([2R, 3S], -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida) é um antibiótico com propriedades antifúngicas, descoberto por Hata *et al.* em 1960. Inibe o crescimento de algumas cepas de fungos por diminuir a quantidade de ergosterol intracelular, e seus efeitos são revertidos por ergocarciferol laurate e oleato, não por outros ácidos graxos, o que levou a suspeita de que cerulenina desempenharia um papel importante como inibidor da biossíntese de esteróis e ácidos graxos (Omura, 1976). Esta droga inibe irreversivelmente a atividade de FASN por se ligar covalentemente ao sítio β -cetoacil sintase (**Fig. 2**), responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda *et al.*, 2000). Devido a sua instabilidade, seu uso como agente antilipogênico é restrito (Omura, 1976; Loftus *et al.*, 2000). Seu análogo sintético **C75** é uma pequena molécula formada por cadeia de 7 carbonos (α -metileno- γ -butirolactona) e que possui efeitos inibitórios comparáveis aos da cerulenina, sendo mais estável e, portanto, apresentando melhores efeitos *in vivo* (Pizer *et al.*, 1998; Kuhajda *et al.*, 2000). O **orlistat** (tetrahidrolipstatina, Xenical[®], Roche, EUA) é um derivado semi-sintético da lipstatina e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) para o tratamento da obesidade por inibir irreversivelmente as lipases gástricas e pancreáticas no interior do trato gastrointestinal (Guerciolini, 1997; Lupu e Menendez 2006). Atua inibindo de maneira específica e irreversível o sítio catalítico tioesterase de FASN (**Fig. 2**), o qual é responsável pela liberação do palmitato pela ACP (Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005b). 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 *et al.*, 2002). Entre os **polifenóis** podemos citar a substância **EGCG** (*epigallocatequina-3-galato*), que é um componente do chá verde e tem demonstrado atividades comparáveis as da cerulenina e do C75 por bloquear FASN no sítio β -cetoacil sintase (Wang e Tian, 2001).

2.1.3 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 *et al.*, 1996a;1996b; 1998; Furuya *et al.*, 1997; Kuhajada *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2004; 2005a). Em estudo prévio feito por nosso grupo foi demonstrado que a cerulenina é também capaz de inibir o crescimento de fibroblastos gengivais humanos normais em culturas primárias (Almeida *et al.*, 2005), em outro estudo foi demonstrado que cerulenina e orlistat inibem o crescimento de células endoteliais da aorta de coelhos (RAEC), além de causar inibição da proliferação por reduzir o número de células na fase S do ciclo celular e aumentar significativamente as células em G0/G1 (Seguin *et al.*, 2012). Assim como o orlistat reduz a taxa de proliferação de células endoteliais de cordão umbilical humano (Browne *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 fosfolípídeos de membrana e a síntese destes fosfolípídeos é bloqueada quando há inibição da síntese de ácidos graxos (Jackowski *et al.*, 2000; Menendez *et al.*, 2005b). A biossíntese de fosfolípídeos 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 da fase G1 provavelmente por inibir a síntese de ácidos graxos destinados à síntese de membranas celulares (Menendez *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^{Kip1}, levando as células de carcinoma de estômago (NCI-N87), à apoptose (Menendez *et al.*, 2005a). Recentemente demonstramos que em células B16-F10 derivadas de melanoma murino, o tratamento com orlistat resulta em acúmulo da proteína p27^{Kip1}, uma das principais proteínas responsáveis pela repressão do ciclo celular nas fases G0/G1, ao mesmo tempo em que reduziu os níveis da proteína Skp2, responsável pela ubiquitinação e subsequente degradação da proteína p27^{Kip1} (Carvalho *et al.*, 2008). Carvalho *et al.* (2008) e Zecchin *et al.* (2010) mostraram nítida inibição da progressão do ciclo celular com aumento de células nas fases G0/G1 e diminuição de células nas fases S e G2/M, após a inibição de FASN com orlistat ou cerulenina, em células de melanoma B16-F10. Por outro lado, alguns trabalhos também mostram que a inibição de FASN resulta em acúmulo de células nas fases G2/M do ciclo celular. Li *et al.* (2001) mostraram redução de células na fase S e redistribuição de células nas fases G1 e G2/M, após a inibição de FASN com cerulenina ou C75, em células de carcinoma de cólon, RKO. Furuya *et al.* (1997) mostraram que a inibição de FASN com cerulenina levou a um bloqueio da proliferação com acúmulo de células de câncer de próstata (TSU-prl) nas fases G2/M do ciclo celular.

O aumento dos índices de apoptose após inibição de FASN reforça o papel essencial desta enzima na sobrevivência de células tumorais (Flavin *et al.*, 2010; Kant *et al.*, 2012). Em trabalho realizado por Zecchin *et al.* (2010), foi demonstrado que a inibição

específica da atividade de FASN em linhagem celular de melanoma murino, B16-F10, induz a via intrínseca da apoptose, com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3 (Zecchin *et al.*, 2010). Bandyopadhyay *et al.* (2006) demonstraram aumento de células TUNEL positivas, *in vitro*, em linhagem de câncer de mama MCF-7 após silenciamento de FASN, assim como Murata *et al.* (2010), em metástases hepáticas de animais BALB/C inoculados com células de Colon 26 e tratados com cerulenina. Desse modo, a inibição farmacológica da enzima FASN parece ser seletivamente citotóxica para as células neoplásicas, resultando em inibição da progressão do ciclo celular, com significativa redução da proliferação e aumento das taxas de apoptose (Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2004).

2.2 Ciclo celular

Ciclo celular é uma série de eventos coordenados através dos quais a célula duplica seu conteúdo e se divide. Tradicionalmente o ciclo celular é dividido em 4 fases (**Fig. 3**): G1, S, G2 e M. As fases G1, G2 e S em conjunto são chamadas de intérfase, sendo G1 e G2 fases de intervalo (G = *gap*), que fornecem tempo para a célula crescer e averiguar o meio interno e externo, e S, a fase de síntese onde ocorre a duplicação do DNA (Malumbres e Barbacid 2001; Alberts *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Hochegger *et al.*, 2008). A fase M corresponde à mitose, quando os cromossomos são separados e as células divididas (citocinese) (Nurse, 1997; Cooper e Hausman, 2009). Depois que a citocinese é completada, a nova célula gerada pode continuar a divisão celular ou interromper sua proliferação. Células que escolhem a última opção entram em um estado conhecido como “quiescência” ou G0. As células que continuam a proliferar avançam para a fase G1 de um novo ciclo (Malumbres e Barbacid, 2005).

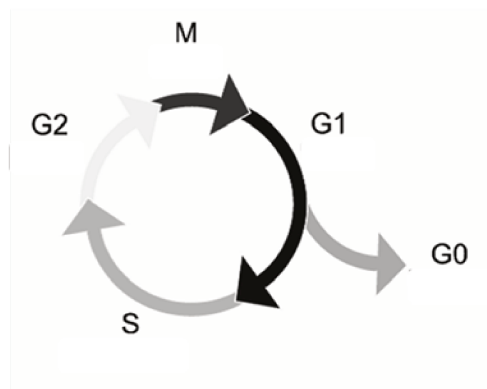


Fig. 3: Representação das fases do ciclo celular. A intérfase é formada pelas fases G1, S e G2, enquanto M representa a fase mitótica. Células em repouso permanecem em G0.

A duração de cada fase do ciclo varia entre os diferentes tipos de células. Para uma célula humana típica e em proliferação, o ciclo dura cerca de 24 h, sendo que a intérfase pode ocupar 23 destas horas (Alberts *et al.*, 2004).

Para assegurar a correta progressão do ciclo celular, as células apresentam uma série de pontos de checagem, os quais previnem que a célula entre em uma fase até que tenha completado com sucesso a fase anterior. Desequilíbrios nestes controles resultam em proliferação descontrolada e possibilitam o crescimento neoplásico (Malumbres e Barbacid, 2001). Existem 4 pontos de checagem, bem caracterizados, sendo estes modulados por fatores internos e externos. Ao final da fase **G1** existe um ponto após o qual a célula está comprometida com o ciclo, chamado “ponto de restrição”, termo este proposto por Arthur Pardee em 1974. O ponto de restrição em G1 corresponde ao ponto de checagem onde são verificados tamanho e estado fisiológico da célula, bem como as interações com o meio extracelular. Caso haja alguma alteração nesses parâmetros, as células podem interromper a proliferação e/ou entrar em morte por apoptose. O ponto de checagem da fase **S** averigua possíveis erros na replicação do DNA. Ao final de **G2** há

busca por DNA danificado ou não duplicado, além de análise da correta duplicação dos centrossomos. Na fase **M**, o ponto de checagem identifica se os cromossomos foram corretamente alinhados ao fuso mitótico (Malumbres e Barbacid, 2001; Bucher e Britten, 2008).

2.2.1 Controle do ciclo celular

A progressão pelas fases do ciclo celular é resultado de uma seqüência de ativações e inibições de quinases dependentes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases – cdks*), enzimas que regulam positivamente o ciclo celular, sendo que a interação dessas serinas/treoninas quinases com suas respectivas **ciclinas** permite a correta progressão do ciclo em células normais (Malumbres e Barbacid, 2005; Fecher *et al.*, 2009). O termo “quinase dependente de ciclina” foi estipulado durante o *Cold Spring Harbor Symposium on Cell Cycle* em 1991, segundo o qual uma quinase só deve ser chamada de cdk se sua atividade for dependente da associação com algumas subunidades regulatórias ciclina-*like* (Malumbres e Barbacid, 2005; Malumbres *et al.*, 2009).

O nível das ciclinas oscila durante o ciclo celular e sua disponibilidade é uma maneira de controlar a atividade das cdks e a proliferação celular (Neganova e Lako, 2008). A atividade das cdks é regulada em múltiplos níveis, incluindo síntese, degradação fosforilação e desfosforilação de ciclinas, assim como síntese, ligação, degradação e localização subcelular de proteínas inibidoras de cdks (*cdk inhibitors – cki*) (Carnero, 2002).

As ckis são proteínas conhecidas como inibidores de quinases dependentes de ciclinas e controlam a ativação ou inibição de complexos quinases (Ellis *et al.*, 1999). São

divididas em duas famílias (van Riggelen e Felsher, 2010). A família **kip/cip** (*kinase inhibitor protein/cyclin-dependent kinase interacting protein*) é composta por p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}, e a família **Ink** (*inhibitor of kinase*) composta por p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c} e p19^{Ink4d} em ratos ou p14^{Arf} em humanos (Ellis *et al.*, 1999, Joyce e Harris, 2010). Todas as ckis resultam em parada do ciclo celular após serem ativadas por estímulos antimitogênicos ou quando superexpressas (Carnero, 2002). Muitos tumores apresentam alteração na atividade de ckis, indicando que estas proteínas são críticas para o controle da proliferação neoplásica (Ellis *et al.*, 1999).

O número de cdks e ciclinas tem aumentado consideravelmente durante a evolução, porém somente alguns complexos ciclinas/cdks são necessários para o controle da progressão do ciclo celular (Malumbres e Barbacid, 2009). Por exemplo, para dar início à fase S, é necessária a formação dos complexos ciclina D/cdk4/6 e ciclina E/cdk2, enquanto que, para se progredir pela fase S, é necessária a formação do complexo ciclina A/cdk2 (Hochegger *et al.*, 2008; Fecher *et al.*, 2009).

As cdks são ativadas quando se ligam a suas moléculas regulatórias, as **ciclinas**, as quais constituem um grupo diversos de proteínas de 35 a 90 kDa, que se acumulam durante a interfase e são destruídas na mitose. Existem mais de 16 ciclinas humanas, as quais atuam nas fases G1, G2 e M do ciclo celular. A degradação dessas proteínas a cada ciclo celular é mediada por ubiquitina e o proteossomo 26S (Malumbres e Barbacid, 2005; Li *et al.*, 2006; Abbas e Dutta, 2009; Malumbres e Barbacid, 2009).

O aumento da proliferação celular na ausência de estímulos externos é uma característica comum aos tumores malignos, do mesmo modo que distúrbios no controle normal do ciclo celular geram instabilidades genômicas que contribuem para o

desenvolvimento e/ou progressão de muitas malignidades (Li *et al.*, 2006; Malumbres e Barbacid, 2009).

2.2.2 Regulação da transição de G1 para S em células normais e tumorais

Diversas são as proteínas que regulam o ciclo celular. Entre elas está **p21^{WAF1/Cip1}**, proteína que contém 21 kDa, com aproximadamente 166 aminoácidos codificados pelo gene *CDKN1A*, localizado no cromossomo 6 (6p21.2). Pertence à família de ckis kip/cip e se localiza no núcleo e citoplasma das células, embora somente a forma nuclear da proteína p21^{WAF1/Cip1} tenha função de cki (Li *et al.*, 2006; Abbas e Dutta, 2009). p21^{WAF1/Cip1} é ativada pelo supressor de tumor p53 quando há danos no DNA e também age como supressora de tumor, inibindo as cdk e a fosforilação da proteína Rb (Ho *et al.*, 2007; Abbas e Dutta, 2009). p21^{WAF1/Cip1} está envolvida na senescência celular, diferenciação e apoptose através de mecanismos independentes de p53. Apresenta efeitos positivos e negativos na progressão de G1 para S, com predomínio dos efeitos inibitórios. Quando presente em baixas concentrações, p21^{WAF1/Cip1} facilita a ligação de ciclina D1 com cdk4/6, porém em altas concentrações inibe a atividade do mesmo complexo (Li *et al.*, 2006). A inibição da progressão do ciclo mediada por p21^{WAF1/Cip1} ocorre também pela inibição da atividade de cdk2 (Abbas e Dutta, 2009). Desse modo, p21^{WAF1/Cip1} se liga a uma larga escala de complexos ciclina/cdk, com preferência por aqueles que contêm cdk2 (Li *et al.*, 2006). Redução da expressão de p21^{WAF1/Cip1} está associada com tumores malignos humanos de diversas localizações, tais como carcinoma colorretal, cervical, de cabeça e pescoço, além de carcinoma de pequenas células de pulmão (Abbas e Dutta, 2009). Mutações no gene que codifica p21^{WAF1/Cip1} foram detectadas em melanomas, porém não está claro seu envolvimento na gênese deste tumor. Sabe-se que os níveis de

p21^{WAF1/Cip1} são baixos ou indetectáveis na maioria dos nevos, porém há aumento de sua expressão em melanomas primários e metastáticos (Li *et al.*, 2006; Abbas e Dutta, 2009).

p27^{kip1} (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) é uma proteína nuclear e citoplasmática de 22 kDa, com aproximadamente 198 aminoácidos codificados pelo gene *CDKN1B*, localizado no cromossomo 12p12-12p13 (Malumbres e Barbacid, 2009). É um membro kip da família de ckis, considerada um supressor de tumor, embora somente sua forma nuclear tenha essa função (Polyak *et al.*, 1994; Soos *et al.*, 1996; Matsuda e Ichida, 2006). Apresenta 44% de homologia estrutural com p21^{WAF1/Cip1} na porção N-terminal, agindo de maneira semelhante, por se ligar ao complexo ciclina D/cdk4 e por regular negativamente ciclina E/cdk2 e ciclina A/cdk2 (Li *et al.*, 2006; Hershko, 2008). Os níveis da proteína p27^{kip1} oscilam durante o ciclo celular, sendo mais elevados em G0/G1 e menores em S (Hershko, 2008). A degradação de p27^{kip1} ocorre no final da fase G1, através de um processo dependente de Skp2 (*S phase kinase-associated protein 2*), uma ligase da ubiquitina E3, responsável pela ubiquitinação de p27^{kip1} e que, portanto, permite a passagem de G1 para S (Schrumpp *et al.*, 1996; Loda *et al.*, 1997; Hershko, 2008; Mitra e Fisher, 2009). O gene que codifica p27^{kip1} é raramente alterado em tumores malignos, mas o baixo nível de p27^{kip1} foi associado a um pior prognóstico em tumores de mama, próstata, sarcomas e tumores hematológicos (Ellis *et al.*, 1999; Hershko, 2008). Mutações neste gene são raras em melanomas, porém a transição de nevo para melanoma primário e metastático mostra perda progressiva da expressão de p27^{kip1} (Li *et al.*, 2006).

Skp2 (*S phase kinase-associated protein 2*) possui 45 kDa e é um dos componentes do complexo SCF^{skp2} ubiquitina ligase (*Skp1-Cullin1-F-box protein*). O complexo SFC compreende uma larga família de subunidades de ubiquitinas ligases que

selecionam e ubiquitinam proteínas para a degradação pelo proteossomo 26S (Hershko, 2008). Skp2 tem papel essencial na passagem de G1 para S, uma vez que é responsável pela poliubiquitinação dos reguladores do ciclo celular, p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{kip2} (Schrumpp *et al.*, 1996; Loda *et al.*, 1997; Vodermaier, 2004; Hershko, 2008; Mitra e Fisher, 2009). Skp2 reconhece especificamente p27^{Kip1} fosforilada, diminuindo os níveis desse inibidor de cdk e culminando na progressão do ciclo celular (Chiariello e Esposito, 2006). Os níveis de Skp2 oscilam durante o ciclo celular, atingindo níveis máximos na fase S (Bornstein *et al.*, 2003), sendo que sua degradação é mediada pela ubiquitina ligase APC/C^{Cdh1} (*anaphase-promoting complex/cyclosome and its activator Cdh1*) (Hershko, 2007). Aumento da expressão de Skp2 foi previamente verificado durante os diferentes estágios da progressão do melanoma, assim como em linfomas, sarcomas, carcinoma espinho celular oral, carcinoma gástrico e câncer de mama (Li *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2013).

Dentre as mais de 16 ciclinas humanas, duas possuem papel de destaque na transição da fase G1 para S do ciclo celular: ciclinas D1 e E. A **ciclina D1** é sintetizada no começo da fase G1. Existem três isoformas de ciclina D (D1, D2 e D3), as quais são expressas diferentemente em vários tecidos (Masamha, 2009). O membro mais bem caracterizado da família das ciclinas D é a ciclina D1, a primeira ciclina da fase G1 identificada em mamíferos (Sutherland e Musgrove, 2009). Possui 34 kDa e 295 aminoácidos codificados pelo gene *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13. Forma complexos com cdk4/6, o que resulta na fosforilação e inativação de Rb e liberação de E2F, levando à progressão do ciclo celular. Tais eventos facilitam a ativação de ciclina E/ckd2 e ciclina A/ckd2, complexos necessários para a entrada e progressão na fase S (Li *et al.*, 2006). Desse modo, quando não há proliferação, não há formação dos complexos

com cdk2 e, portanto, os níveis das ciclinas caem rapidamente. Ciclina D1 é raramente mutada, mas sua superexpressão confere uma vantagem de crescimento seletivo e, conseqüentemente, age como um indutor de crescimento em várias neoplasias malignas como, por exemplo, no câncer epitelial de ovário e câncer de mama (Masamha *et al.*, 2009). Níveis altos e constantes de ciclina D1 foram demonstrados em linhagens celulares de melanomas, bem como em metástases desse tumor (Li *et al.*, 2006; Masamha *et al.*, 2009).

O gene humano da **ciclina E**, *CCNE*, foi mapeado no cromossomo 19 (19q12-q13) e codifica polipeptídeos com peso molecular variando entre 39 a 52 kDa (Demetrick *et al.*, 1995). A proteína “regular” ciclina E, de 45 kDa, contém um domínio que se estende do aminoácido da posição 129 a 215, chamado *cyclin Box*, cuja sequência é conservada entre as ciclinas (Moroy e Geisen, 2003). Já foram descobertos *splicings* alternativos com potencial para produzir isoformas de ciclina E, mas não está claro se estas isoformas estão relacionadas com fenótipos específicos no ciclo celular (Moroy e Geisen, 2003). Em células normais, a expressão de ciclina E ocorre no final da fase G1 e início da fase S, atingindo níveis máximos no ponto de restrição (Harwell *et al.*, 2004), sendo a ativação da transcrição do seu gene depende da atividade de ciclinas D, as quais são sintetizadas primeiramente (Moroy e Geisen, 2003; Barton *et al.*, 2006). Ciclina E se liga e ativa cdk2, iniciando a transição G1→S (Ohtsubo *et al.*, 1995). Na fase final de G1, esse complexo ciclina E/cdk2 tem papel chave na iniciação da duplicação de centrosomos e DNA (Fukasawa, 2008). Assim como outras ciclinas de G1, essa proteína é ubiquitinada pelas multiproteínas do complexo SCF, mas também é estimulada ou inibida por proteínas da família do fator de transcrição E2F, formando com este fator um mecanismo de *feedback* (Moroy e Geisen, 2003). A regulação de ciclina E no ciclo celular é comumente perdida

em células tumorais, levando a uma expressão constitutiva desta ciclina (Harwell *et al.*, 2004). Em células de melanoma a expressão das ciclinas E e A é alta, sendo que essas duas ciclinas se ligam e ativam cdk2 no ciclo celular (Halaban, 1999).

De modo geral, as cdks consistem em subunidades catalíticas, em sua maioria com peso molecular de 34 kDa (Nurse, 1997). Entre as cdks específicas de G1 temos **cdk2** que é uma quinase dependente de ciclinas, produto do gene $p33^{cdk2}$, presente no cromossomo 10 (Meyerson *et al.*, 1992). Participa da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo, onde cdk2 interage com as ciclinas E ou A, sendo sequencialmente ativada por estas ciclinas, formando complexos para a fosforilação sequencial da proteína Rb (Carnero, 2002; Berthet *et al.*, 2003; Hochegger *et al.*, 2008; van Riggelen e Felsher, 2010). Apresenta também um papel importante ao longo da fase S e G2/M regulando eventos-chave no crescimento e divisão celular (Wadler, 2001). A regulação da atividade de ciclina E/Cdk2 ocorre em muitos níveis, incluindo inibidores mediados por ckis como p21^{WAF1/Cip1} e p27^{kip1} (van Riggelen e Felsher, 2010). Desta forma, a inibição de cdk2 se mostra um passo importante no controle do crescimento de células neoplásicas (Wadler, 2001).

Outras duas cdks importantes para o início da fase S são **cdk4** e **cdk6**. Cdk4 é codificada pelo gene *cdk4* mapeado no cromossomo 12q14, enquanto cdk6 é codificada pelo gene *cdk6* mapeado no cromossomo 7q21-q22 (Demetrick, 1994). São proteínas muito próximas, com homologia em 71% de seus aminoácidos e que apresentam propriedades bioquímicas também semelhantes. Ambas ligam-se à família das ciclinas D (D1, D2 e D3) durante G1, inativando Rb (Grossel *et al.*, 1999; Malumbres *et al.*, 2004; Grossel e Hinds, 2006; Malumbres e Barbacid, 2009). Apesar das semelhanças, estudos recentes *in vitro* mostraram que cdk4 e cdk6 fosforilam Rb em resíduos distintos: cdk4

preferencialmente fosforila Rb no resíduo treonina no aminoácido 826, enquanto cdk6 preferencialmente fosforila na treonina 821 (Grossel e Hinds, 2006). Diferenças entre cdk4 e cdk6 têm sido identificadas em diversos modelos experimentais. Em células T, por exemplo, a ativação de cdk6 precede em algumas horas a ativação de cdk4 (Grossel e Hinds, 2006). Aumento da atividade de cdk4 e/ou cdk6 leva à proliferação descontrolada e tumorigênese que, subseqüentemente, desencadeia a inativação de Rb em muitos tipos de tecidos (Grossel *et al.*, 1999). Esse aumento da atividade das cdk's pode ser resultado da superexpressão de subunidades reguladoras, como ciclina D, ou ser resultado da amplificação de genes que codificam tais quinases (Grossel *et al.*, 1999). Aumento da atividade de cdk4 e cdk6 ocorre em diversos tumores malignos humanos, com preferência de cdk4 para tumores epiteliais (tecidos endócrinos e mucosas), incluindo melanoma, e de cdk6 para tumores mesenquimais, incluindo leucemias, sarcomas (Malumbres e Barbacid, 2009). Elevada atividade de cdk6 também foi relatada em carcinoma de células escamosas e neuroblastomas, sem que houvesse alterações da atividade de cdk4 (Grossel e Hinds, 2006).

Localizado no cromossomo 13q14, o gene **Rb** codifica uma proteína nuclear de 928 aminoácidos e com peso molecular de 110 kDa. Se ambos os alelos são mutados no início da vida, a proteína é inativada e resulta no desenvolvimento do câncer retinoblastoma, por isso o nome Rb (Li *et al.*, 2006, Macleod, 2008). Existem três membros da família retinoblastoma de proteínas nucleares, que incluem **Rb**, **p130** e **p107**. Rb é expresso constantemente por células que estejam ou não em proliferação (Burkhart e Sage, 2008). Durante a fase G1, a fosforilação da proteína **Rb** pelos complexos ciclinas/cdk's (ciclina D1/cdk4/cdk6, ciclina E/cdk2 ou ciclina A/cdk2) leva à liberação do fator de transcrição E2F, o qual ativa a transcrição de diversas proteínas necessárias para a progressão da fase S. O complexo ciclina E/cdk2 mantém Rb fosforilado no restante do

ciclo (Li *et al.*, 2006). Em melanomas, ao contrário de mutações no gene, são observadas alterações na função da proteína Rb, em que esta se encontra altamente fosforilada (Li *et al.*, 2006). Em estudos com linhagens celulares de melanoma foi observada uma superexpressão de Rb altamente fosforilada, forma esta que impede sua função (Li *et al.*, 2006).

2.3 Melanoma

Melanoma é um tumor maligno que se origina de melanócitos, células derivadas da crista neural e que se localizam próximas à lâmina basal. A principal função dos melanócitos é a produção de melanina, pigmento que confere cor à pele, cabelos e olhos, protegendo contra a radiação UV (Ibrahim e Haluska 2009, Malumbres e Barbacid 2009). É prevalente em regiões de grande exposição solar como Austrália, sul da Europa, África do Sul e sul dos Estados Unidos (Ibrahim e Haluska 2009). No Brasil corresponde a 4% de todos os tumores de pele e a estimativa de novos casos para 2012 foi de 6.230, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres (INCA 2013). O melanoma é um importante problema de saúde, não só por causa de sua incidência, mas também por conta de seu alto potencial metastático, comportamento agressivo e notável resistência aos tratamentos quimioterápicos e imunológicos (Li *et al.*, 2006). Mais de 90% dos melanomas ocorrem na pele, mas também podem ocorrer em superfícies mucosas, como por exemplo, a mucosa bucal, sendo mais comumente encontrado no palato ou gengiva de pacientes adultos (Andrade *et al.*, 2012). Os melanomas orais são raros, correspondendo a 1-2% de todas as malignidades orais, mas são mais agressivos e de pior prognóstico do que sua contraparte cutânea (Femiano *et al.*, 2008; Hashemi *et al.*, 2008). Os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma incluem múltiplos nevos benignos ou atípicos, história

familiar e história pessoal de melanoma (Ibrahim e Haluska 2009). Outro fator conhecido é a exposição excessiva à radiação UV, responsável por mutações no DNA, ativação de fatores de crescimento, redução das defesas imunes e estímulo para a produção de espécies reativas de oxigênio que, somados, culminam em danos irreversíveis ao material genético (Malumbres e Barbacid 2009). Por outro lado o melanoma oral não está associado à exposição solar, mas outros fatores como fumo e álcool são citados como fatores de risco para a mucosa oral (Femiano *et al.*, 2008).

Embora os fatores de risco sejam conhecidos, os mecanismos moleculares em torno desta doença ainda não estão elucidados (Li *et al.*, 2006). Desequilíbrios nas funções das proteínas regulatórias da fase G1 do ciclo celular, como deficiência de Rb, ou $p16^{Ink4a}$, mutação de *cdk4* ou superexpressão de ciclina D1, constituem um passo comum para o desenvolvimento do melanoma (Li *et al.*, 2006). Também já foram descritas mutações nos genes *NRAS*, *BRAF*, *PTEN*, $p16^{INK4A}$, *APAF1*, *MITF*, *BCL-2*, *cKIT*, *TP53*, *AKT3*, *mTOR* envolvendo melanomas cutâneos (Ibrahim e Haluska 2009).

Tendo-se em vista que (i) em várias neoplasias malignas, dentre as quais o melanoma, a alta expressão de FASN está associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástase e, conseqüentemente, pior prognóstico, (ii) e que existem evidências de que, nas células malignas, a atividade de FASN é necessária para a produção de fosfolípidios que compõem as membranas celulares, o principal objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da inibição de FASN com C75 sobre proliferação celular, apoptose e também sobre algumas proteínas envolvidas na transição das fases G0/G1 para S do ciclo celular em células de melanoma murino B16-F10.

3 PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO GERAL

Analisar *in vitro* e *in vivo* os mecanismos antiproliferativos decorrentes da inibição de FASN em células de melanoma murino B16-F10.

3.1. PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

- ✓ Verificar, *in vitro* e *in vivo*, as taxas de proliferação e de apoptose das células de melanoma B16-F10 em camundongos tratados com C75.
- ✓ Analisar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da inibição de FASN com C75 sobre os níveis de diversas proteínas envolvidas na transição das fases G0/G1 para S do ciclo celular.
- ✓ Verificar, *in vitro*, a especificidade da ação antiproliferativa de C75 através do silenciamento de FASN com RNA de interferência (RNAi) e posteriores Western blottings para algumas proteínas do ciclo celular.
- ✓ Avaliar, *in vivo*, os efeitos da inibição de FASN com C75 sobre a formação e o tamanho de tumores subcutâneos de células B16-F10.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de Células

Células B16-F10, derivadas de melanoma de camundongo, foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA) e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen), na diluição de 1:100, a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

As células foram cultivadas até atingirem 80% de confluência. Para a manipulação das células, o meio de cultura era removido e as células lavadas com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. Em seguida, as células eram incubadas com 2 mL de tripsina a 2% até seu desprendimento total da superfície. A ação da tripsina era interrompida pela adição de 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. A suspensão de células era transferida para tubos cônicos de plástico estéreis de 15 mL (Corning, EUA) e centrifugada a 4.000 rpm por 3 min. O sobrenadante era removido e descartado e o *pellet* de células ressuspensas em 10 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Cerca de 1 µL do homogenato de células foi usado para as contagens em contador de células automático - Countess (Life Technologies, EUA) e posterior montagem dos experimentos. Visando trabalhar com células em passagens semelhantes várias amostras foram congeladas antes da realização dos experimentos. Para isto, as células foram ressuspensas em solução

contendo 20% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, EUA) e 80% de SFB e congeladas em nitrogênio líquido.

4.2 Preparo do C75

C75 (Sigma, EUA) foi dissolvido em DMSO para uma concentração final estoque de 20 mg/mL e armazenado a 4°C. As células do grupo controle receberam o mesmo volume de DMSO que as células tratadas com as diferentes concentrações de C75 não ultrapassando o volume máximo de 0,05%.

4.3 Curva de Proliferação

Para avaliarmos os efeitos citotóxicos e antiproliferativos do C75, cerca de 20.000 células foram plaqueadas em 2 mL de meio suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, contendo concentrações crescentes de C75 (1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µg/mL). Após 48 h de tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de meio de cultura não suplementado. O número total de células foi determinado em citômetro de fluxo após 1 min de leitura em velocidade de 60 µL/min (Naliwaiko *et al.*, 2008).

4.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A porcentagem de células viáveis após tratamento com C75 foi determinada usando *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT, Sigma), uma vez que células viáveis são capazes de reduzir o sal *tetrazolium*, de cor amarela, em *formazan*, de cor púrpura (Mosmann, 1983). Cerca de 20.000 células foram plaqueadas em 2 mL de meio suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, contendo concentrações crescentes de C75. Completadas 48 h de tratamento, o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura não suplementado, preparado com 0,3 mg/mL de MTT sendo as células incubadas por 3 h a 37°C em atmosfera a 5% de CO₂ e 95% de umidade. Em seguida o meio de cultura foi desprezado e, em cada poço, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto (Merck, Alemanha), para a solubilização do *formazan* produzido. O conteúdo de cada poço foi homogeneizado e transferido para placas de 96 poços, obtendo-se a leitura da absorbância a 540 nm em leitor automático de ELISA (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação aos controles.

4.5 Avaliação das taxas de apoptose

As porcentagens de células em apoptose foram determinadas pelas marcações com Anexina V-FITC (Caltag, Inglaterra) e 7-AAD (7-Amino-actinomycin D, Molecular Probes, Invitrogen), respectivamente. Cerca de 30.000 células foram plaqueadas em 2 mL de meio suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, contendo diferentes concentrações de C75.

Após 48 h de tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e incubadas com 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Anexina V-FITC e 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 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_2 e 1,8 mM de CaCl_2 , no escuro, à temperatura ambiente. Após 20 min, as células foram analisadas em citometria de fluxo, em canais FL1 (Anexina V) e FL2 (7-AAD).

4.6 Análise do ciclo celular

A porcentagem de células B16-F10 em cada fase do ciclo celular foi determinada após marcação com iodeto de propídeo ([Carvalho et al., 2008](#); [Zecchin et al., 2010](#)). Cerca de 18.000 células B16-F10 foram plaqueadas em 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco na ausência de SFB, a fim de se promover a sincronização das células. Após mais 24 h, o meio de cultura foi novamente trocado e as células foram tratadas com concentrações crescentes de C75, na presença de 10% de SFB. Completado o tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e fixadas em etanol 70% gelado a -20°C por, pelo menos 12 h. Para a marcação das fases do ciclo celular, as células foram lavadas com PBS gelado e tratadas com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase (Sigma) a 37°C durante 1 h. Em seguida, as células foram coradas com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídeo a 4°C , no escuro, por 2 h e analisadas em citometria de fluxo, em canal FL2. Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, utilizou-se o programa ModFit LTTM (Verity Software House, EUA).

4.7 Lipogênese

Os ensaios de lipogênese foram realizados no laboratório da Prof^a. Dr^a. Helena C.F. Oliveira, com a ajuda de sua aluna de doutorado Helena F. Raposo, no Laboratório de Lípidos, do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Verificamos as porcentagens de inibição da atividade de FASN após tratamento das células B16-F10 com C75, através de medidas de lipogênese com acetato marcado com ¹⁴C. Foram semeadas 2×10^5 células B16-F10 em placas de cultura de 150 mm de diâmetro, em 10 mL de RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Após 24 h, as células foram tratadas com 7,5 e 10 µg/mL de C75 por 6 h. Após o tratamento, as células foram lavadas, tripsinizadas e contadas em contador de células automático - Countess (Life Technologies, EUA). Em seguida, foram preparadas amostras contendo 10^6 células em 1 mL de RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, em triplicata. As células foram incubadas com 1 mM de acetato e 1 µCi de ¹⁴C-acetato (Perking Elmer) por 2 h a 95% O₂/5% CO₂ e 37°C, sob leve agitação. A extração de lipídios foi realizada com metanol e clorofórmio 2:1 (v/v), sob agitação constante, durante 30 min a temperatura ambiente (Bligh e Dyer 1959; Levin *et al.*, 1992).

4.8 Modelo animal de melanoma

O modelo animal utilizado neste trabalho para o estudo foi descrito Prof. Silvio S. Veiga (Departamento de Biologia Celular, UFPR). A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (n °2321-1, CEUA-IB-UNICAMP – **Anexo I**).

Camundongos C57Bl/6, com cerca de 5 semanas de vida, foram obtidos junto ao CEMIB-UNICAMP e mantidos em gaiolas apropriadas, alimentados com ração comercial Labina (Purina, Brasil) e providos de água *ad libitum*. Os animais permaneceram em sala climatizada, com controle automático de iluminação, alternando períodos claros e escuros a cada 12 h, sendo pesados semanalmente. Realizamos implantes intraperitoneais de células B16-F10 ($2,5 \times 10^5$) em passagem baixa, suspensas em PBS tamponado e, após 48 h das inoculações, os animais foram aleatoriamente divididos em grupo controle e tratado. Foi iniciado o tratamento semanal com 20 mg/kg de peso corporal de C75, intraperitoneal, em 0,1 mL de PBS e os animais do grupo controle receberam somente o veículo (20% DMSO/80% PBS) (Pizer *et al.*, 2000; Horiguchi *et al.*, 2008). Após 14 dias da inoculação das células tumorais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e imediatamente dissecados. Os tumores primários intraperitoneais foram coletados e divididos em duas partes: uma parte foi fixada em formol 10% e outra parte foi imediatamente congelada a -80°C para as extrações protéicas.

4.9 Western blotting

4.9.1 Obtenção dos extratos protéicos

Os tumores congelados e as células cultivadas foram preparados para extração protéica em tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton X-100, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA, 1 mM de NaF e 1 mM de Na_3VO_4 . Os inibidores de protease PMSF (1 mM), leupeptina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), inibidor de tripsina (*soybean trypsin inhibitor*, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e aprotinina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) foram adicionados ao tampão de lise no momento do uso. Os tumores foram macerados em homogeneizador

do tipo Pellet Pestles (Sigma, EUA) contendo tampão de lise em proporção de aproximadamente 3,5 g/mL. A solução protéica foi mantida no gelo por 30 min, sendo homogeneizada a cada 10 min. Em seguida, a solução foi centrifugada a 15.000 rpm por 15 min a 4°C, os sobrenadantes foram imediatamente separados e foi realizada a quantificação da concentração de proteínas totais de cada extrato pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Imediatamente após a dosagem, os extratos foram armazenados a -80°C.

4.9.2 Separação eletroforética de proteínas e Western blotting

Cerca de 40 µg de proteínas totais foram preparadas em tampão de amostra redutor concentrado quatro vezes (8% de SDS, 0,25 M de Tris-HCl (pH 6,8), 30% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol), contendo 20% do volume total de Ditioneitol (DTT, Sigma), fervidas por 5 min e separadas eletroforicamente em géis de poliacrilamida-SDS a 6 ou 12%, dependendo do peso molecular da proteína a ser estudada. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher e Schuell, EUA) e coradas com "Ponceau S" (Sigma) para verificar a eficácia da transferência. Após bloqueio por 18 h a 4°C em solução a 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM de NaCl e 1% de Tween 20 (TBST), as membranas foram cortadas de acordo com o peso molecular da proteína a ser estudada e incubadas com anticorpos primários descritos na **Tabela I**, diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado, por 2 h a 24°C, sob agitação constante. Depois de lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, as reações foram reveladas através

de quimioluminescência utilizando-se o kit de detecção ECL (Western Blotting Analysis System, Amersham Pharmacia Biotech, EUA) e expostas a filmes ultra-sensíveis (Hyperfilm Ultra Detection, Amersham). Após secagem, as películas radiográficas foram digitalizadas em escâner GS 700 (Bio Rad, EUA) para a realização da densitometria óptica das bandas utilizando-se o programa Scion Image (Scion Corporation, EUA). Para cada proteína estudada, foram consideradas as áreas de pico correspondentes como valor da densidade óptica. Todas as bandas tiveram seus valores normalizados pelo valor da leitura da banda da beta-actina respectiva de cada proteína estudada.

Tabela I: Relação dos anticorpos utilizados, incluindo clones, peso molecular (kDa) e diluições.

Anticorpo	Clone e Marca	Peso Molecular (kDa)	Diluição
FASN	23 (BD Pharmigen)	270	1:3.000
p21^{WAF1/Cip1}	C-19 (Santa Cruz)	21	1:200
p27^{Kip1}	57 (BD Pharmigen)	27	1:500
Skp2 p45	H-435 (Santa Cruz)	45	1:1.000
ciclina E	M-20 (Santa Cruz)	53	1:1.000
ciclina D1	DCS-6 (Calbiochem)	34	1:200
cdk2	M2 (Santa Cruz)	34	1:30.000
cdk4	C-22 (Santa Cruz)	34	1:50.000
cdk6	C-21 (Santa Cruz)	36	1:1.000
beta-actina	AC-15 (Sigma)	45	1:60.000

4.10 Verificação das taxas de proliferação tumoral *in vivo*

Para avaliação da proliferação das células de melanoma *in vivo*, utilizamos camundongos C57Bl/6 portadores de tumores intraperitoneais e tratados semanalmente com 20 mg/kg de peso corporal de C75 ou DMSO (20% DMSO/80% PBS), conforme descrito no item 4.8. Após 14 dias das inoculações das células tumorais, os animais receberam 10 mM de solução de BrdU (BD Pharmigen) intraperitonealmente, de acordo com as instruções do fabricante. Após 2 h, os animais foram sacrificados, os tumores primários intraperitoneais foram coletados, fixados em formol tamponado a 10% por menos de 12 h, e então processados para a realização dos cortes em parafina, a 3 µM de espessura. Após a desparafinização dos cortes e bloqueio da enzima peroxidase com H₂O₂ a 3%, seguiu-se com a digestão do DNA usando HCL 0,1 M. Esta digestão foi inativada com NaOH a 0,1 M e as lâminas foram incubadas com anticorpo primário contra BrdU por 1 h, em câmara úmida a temperatura ambiente. Após lavagens com PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário por mais 30 min. A revelação foi realizada com DAB (3,3'diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma) e a contra-coloração com hematoxilina de Carazzi. Em seguida as lâminas foram montadas e fotografadas após a secagem. Cinco campos de cada lâmina foram selecionados, de forma randomizada, e seguiu-se a contagem das células marcadas e não marcadas pelo programa MacBiophotonics ImageJ (Image Processing and analysis in Java). As taxas de proliferação celular foram expressas em porcentagem em relação aos controles.

4.11 Verificação das taxas de apoptose *in vivo*

As reações foram realizadas em cortes histológicos dos tumores primários intraperitoneais fixados em formol, utilizando kit comercial da Roche (Suíça) e seguindo as instruções do fabricante. Na primeira etapa, todos os cortes foram desparafinizados e permeabilizados com proteinase-K (20 mg/mL) em solução de Tris-HCl 10 mM (pH 7,4-7,8). Na sequência, as lâminas foram tratadas com DNase e posteriormente incubadas com soluções diferentes para os controles positivo e negativo. Após o período de 1 h a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência. Em seguida, as células TUNEL positivas e negativas foram contadas pelo programa MacBiophotonics ImageJ (Image Processing and analysis in Java). As taxas de apoptose foram expressas em porcentagem em relação aos controles.

4.12 Avaliação da formação e tamanho de tumores

Para avaliarmos a formação de tumores e os efeitos do tratamento com C75, foram inoculadas $2,5 \times 10^5$ células B16-F10 juntamente com 100 μ L de Matrigel (BD Biosciences, EUA), na região subcutânea do dorso de 20 camundongos C57Bl/6. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos e foram tratados semanalmente com 30 mg/kg de peso corporal de C75 ou o equivalente com DMSO. Duas vezes por semana os animais eram pesados, anestesiados e as dimensões dos tumores eram determinadas com auxílio de um paquímetro. O volume dos tumores foi expresso em mm^3 e calculado pela seguinte fórmula $V=0,5 \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$ de acordo como descrito por [Colleta et al. \(2004\)](#).

4.13 Silenciamento de FASN

As células B16-F10 foram semeadas em placas de 6 poços, em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, sem a presença de antibióticos, até atingirem 50% de confluência. Em seguida, as células foram transfectadas com 200 nM de anti-FASN *small interfering RNA* (siRNA) Oligo 1: 5' CAA TGA TGG CCA ACC GGC TCT CTT T 3' (Mus musculus FASN (NM_00798), correspondente para nucleotídeos 940-964); Oligo 2: 5' TGG GAA GAC CCG AAC TCC AAG TTA T 3' (Mus musculus FASN (NM_00798), correspondente para nucleotídeos 3408-3432); e Oligo 3: 5' CCT CTG GGC ATG GCT ATC TTC TTG A 3' (Mus musculus FASN (NM_00798), correspondente para nucleotídeos 5841-5865); ou com 200 nM do Oligo controle (Invitrogen *Stealth™ RNAi Negative Control Duplexes*); com 2 µg/mL Lipofectamina 2000 (Invitrogen), conforme descrito por [Carvalho et al. \(2008\)](#) e [Zecchin et al. \(2010\)](#). As soluções contendo as sequências de siRNA e Lipofectamina foram preparadas em OptiMEM (Gibco (Invitrogen), adicionando-se apenas 2,4 g de bicarbonato de sódio para cada litro preparado, conforme recomendações do fabricante. As células foram lavadas em PBS e então adicionado 900 µL de meio de cultura Opti-MEM em cada poço, sem SFB e antibióticos e, em seguida, adicionados os complexos siRNA/lipofectamina. Após 4 h de transfecção, foram adicionados 500 µL de meio Opti-MEM suplementado com 6% de SFB, para a concentração final de SFB de 2%. Cerca de 48 h após a transfecção, as células foram coletadas para análise de ciclo celular por citometria ([Zecchin et al., 2010](#)) e para verificação dos níveis das proteínas p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, Skp2 e cdk2, através de Western blotting, conforme descrito no item 4.9.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm EPM (erro padrão da média) de, pelo menos, três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. A significância estatística dos resultados foi verificada através da análise de variância não paramétrica do teste *t* de Student e teste de Mann-Whitney, com o auxílio do programa computacional SigmaStat (Jandel Scientific Software, EUA). O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Inicialmente foram verificados os efeitos do tratamento com C75 sobre o crescimento de células B16-F10 em cultura. As primeiras curvas de proliferação foram realizadas após 24 h de tratamento com C75, porém neste período não foram observadas alterações morfológicas nem alteração no número de células totais (*dados não mostrados*). Desse modo, aumentamos o tempo de tratamento para 48 h e a contagem do número total de células mostra que houve inibição dose-dependente da proliferação das B16-F10, como mostra a **Fig. 4**. Esta redução foi estatisticamente significativa para a concentração de 10 µg/mL de C75. Tais dados estão de acordo com as observações visuais verificadas em cultura utilizando microscópio de contraste de fase, onde verificamos não só um menor número de células após tratamento com C75, mas também alterações morfológicas, como a formação de projeções/prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 5**). Em nosso trabalho de mestrado, foi demonstrado que a cerulenina também apresenta inibição dose-dependente da proliferação das células B16-F10, a partir de 1,0 µg/mL, porém tal redução é vista após 24 h de tratamento ([Ortega, 2010](#)). Isso sugere uma menor eficácia de inibição da proliferação do C75 quando comparado à cerulenina, o que foi previamente proposto por [Ho et al. \(2007\)](#) em células de melanoma A-375.

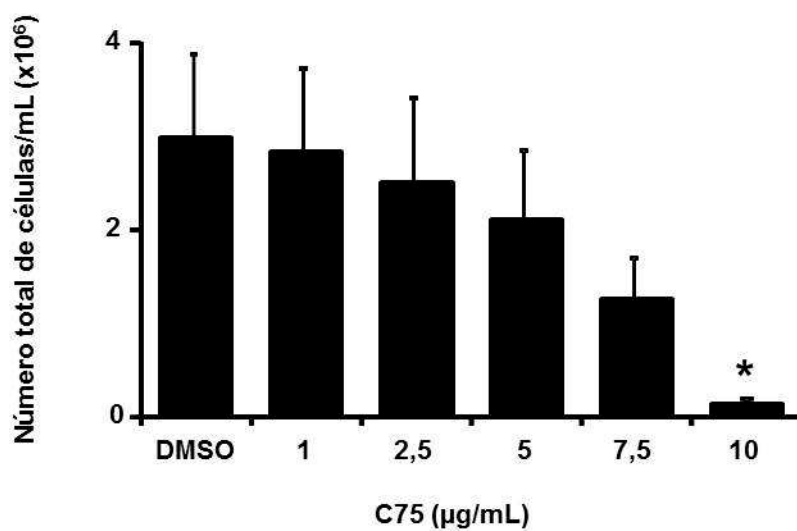


Fig. 4: O tratamento com C75 reduziu o número total de células de melanoma B16-F10. As células B16-F10 foram tratadas com doses crescentes de C75 por 48 h, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, somente as células aderidas foram coletadas e contadas em citômetro de fluxo. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, C75 versus DMSO, teste *t* de Student.

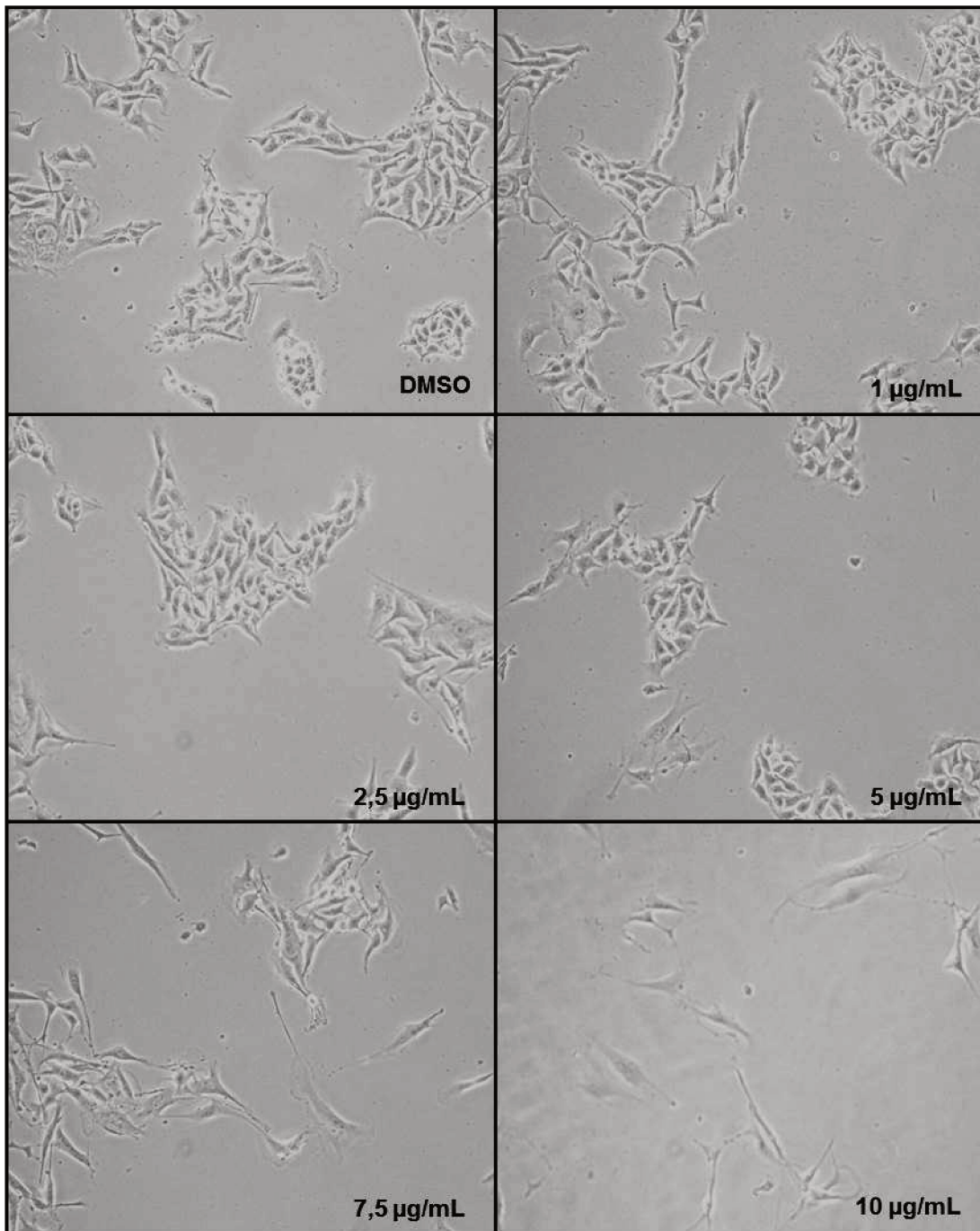


Fig. 5: Alterações morfológicas das células B16-F10 após 48 h de tratamento com concentrações crescentes de C75. As células B16-F10 foram tratadas com doses crescentes de C75 por 48 h, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Nota-se redução do número de células e aumento dos prolongamentos citoplasmáticos de maneira dose-dependente, em relação às células controle (DMSO).

Foram realizados ensaios de viabilidade por MTT após 48 h de tratamento das células B16-F10 com C75. Foi verificada redução da viabilidade celular de maneira dose-dependente em relação às células controle (**Fig. 6**). Apesar da ausência de alterações morfológicas com doses baixas (**Fig. 5**), a redução da viabilidade foi significativa a partir da dose mínima testada, de 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Resultado semelhante foi obtido em nosso trabalho de mestrado (Ortega, 2010), utilizando cerulenina nas mesmas concentrações, entretanto após 24 h de tratamento. Estes achados também sugerem que a cerulenina seja mais eficaz na inibição da proliferação e redução da viabilidade celular do que C75, uma vez que apresenta a mesma eficiência em menor tempo de tratamento. Em células de câncer de cólon (colo 201), por exemplo, cerulenina também apresentou dados mais significativos do que C75, em ensaio de MTT (Ho *et al.*, 2007)

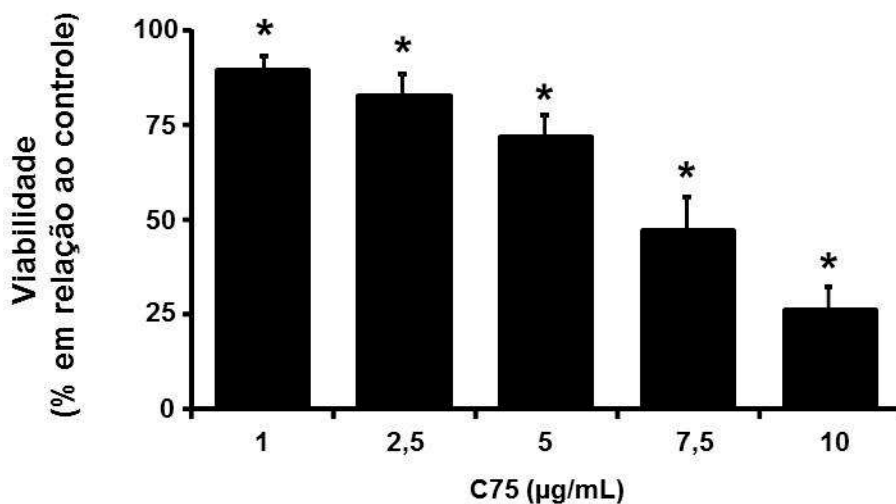


Fig. 6: O tratamento com C75 reduziu a viabilidade das células de melanoma B16-F10. As células B16-F10 foram tratadas com doses crescentes de C75 por 48 h, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, C75 *versus* DMSO (controle), teste *t* de Student.

Com base nas alterações morfológicas e nos resultados anteriormente mostrados, as condições experimentais estabelecidas para os demais experimentos foram tratamentos com 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL de C75.

A literatura é unânime em demonstrar que a inibição de FASN resulta em morte por apoptose em diferentes linhagens de células tumorais (Pizer *et al.* 1996a, 1996b, 1998, Furuya *et al.* 1997, Kuhajada *et al.* 2000, Li *et al.* 2001, Knowles *et al.* 2004, Kridel *et al.* 2004, Menendez *et al.* 2004, 2005c). Em trabalhos prévios de nosso grupo, mostramos que a inibição de FASN com cerulenina ou orlistat induz apoptose nas células B16-F10 (Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin *et al.*, 2010). Em nosso trabalho de mestrado observamos níveis significativos de apoptose em células B16-F10 após tratamento com 10 µg/mL de cerulenina por 24 h (Ortega, 2010). No presente projeto, células B16-F10 tratadas com C75 por 24 h apresentaram níveis de apoptose baixos e semelhantes ao controle (*dados não mostrados*), concordando com os resultados das curvas de proliferação e de viabilidade celular mencionados anteriormente. Por outro lado, houve aumento de 8x nas taxas de apoptose das células de melanoma após 48 h de tratamento com 10 µg/mL de C75 (**Fig. 7**). Nestes mesmos períodos de incubação com C75, os índices de necrose não foram significativos (*dados não mostrados*), conforme verificamos anteriormente para as células B16-F10 após tratamento com cerulenina ou orlistat (Zecchin *et al.*, 2010).

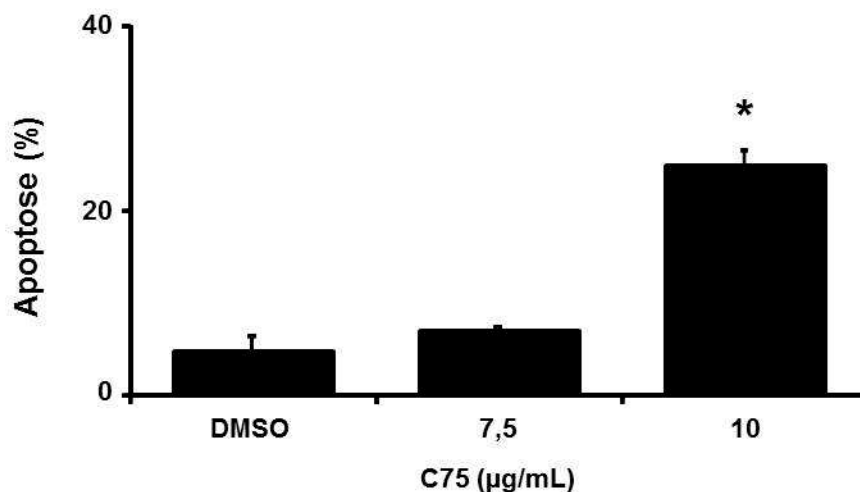


Fig. 7: Níveis de apoptose das células de melanoma B16-F10 após tratamento com C75. As células B16-F10 foram tratadas com doses crescentes de C75 por 48 h, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, a porcentagem de células em apoptose foi estimada após marcação com anexina V-FITC, em citômetro de fluxo. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, C75 versus DMSO, teste t de Student.

A redução do número total de células B16-F10 observada após o tratamento com C75 (**Fig. 4**) sugere que houve morte celular (confirmada na **Fig. 7**) e/ou que houve redução na proliferação destas células. Desse modo, foi determinada a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após 8, 12 e 24 h de tratamento com o inibidor de FASN, C75. Destes três tempos de tratamento testados, observamos uma maior redução de proliferação no período de 12 h, onde se verifica redução de mais de 70% das células na fase S e aumento de mais de 50% de células nas fases G0/G1 após tratamento com C75, em relação aos controles (DMSO) (**Fig. 8**). Tais resultados assemelham-se aos resultados obtidos anteriormente com cerulenina por 24 h (Ortega, 2010). Interessante notar o aumento de 1,7x de células em G2/M após tratamento com C75 que, embora não tenha sido significativo, é comparável a observação de Ho *et al.* (2007), em células de

melanoma humano (A-375). Estes autores relatam que, embora C75 seja um análogo sintético da cerulenina, ele afeta o ciclo celular de maneira diferente, causando parada do ciclo celular em G2/M.

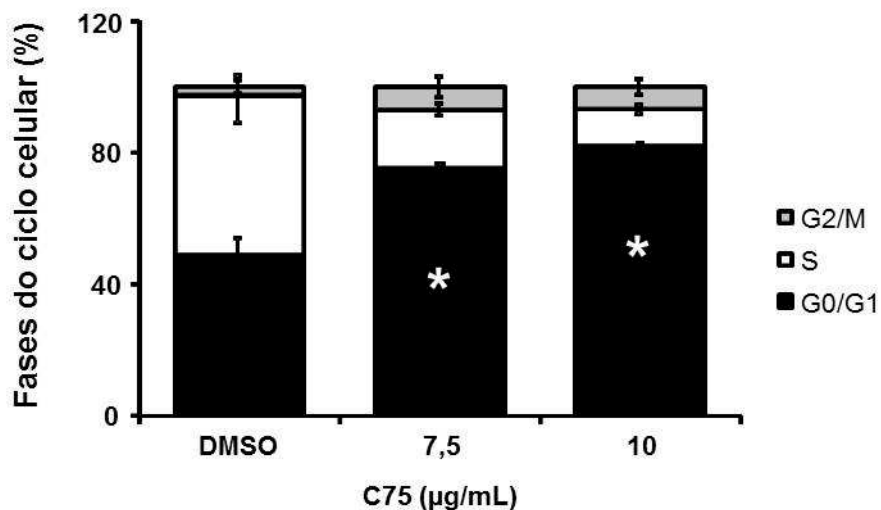


Fig. 8: Distribuição das células de melanoma B16-F10 nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com C75. As células B16-F10 foram plaqueadas, sincronizadas por 24 h na ausência de SFB e tratadas com concentrações crescentes de C75 por 12 h. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada em citometria de fluxo após marcação com de iodeto de propídeo. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, C75 *versus* DMSO, teste *t* de Student.

Diante da redução da proliferação e da viabilidade celular após tratamento com C75, realizamos experimentos para confirmar se os efeitos obtidos foram realmente decorrentes da redução da atividade enzimática de FASN. As células foram tratadas com C75 por um curto período de tempo (6 h) justamente para verificamos se os demais resultados observados após o uso do inibidor por 12 h ou mais seriam decorrentes da real

inibição da atividade de FASN. De fato, a **Fig. 9** mostra que o tratamento das células B16-F10 com C75 por apenas 6 h foi capaz de inibir em cerca de 30% a atividade de FASN, conforme verificado pela redução da lipogênese (Kridel *et al.*, 2004; Browne *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). Previamente verificamos que o tratamento das mesmas células de melanoma com cerulenina ou orlistat resultou em 60 e 50% de inibição da atividade enzimática de FASN, respectivamente (Zecchin *et al.* 2010).

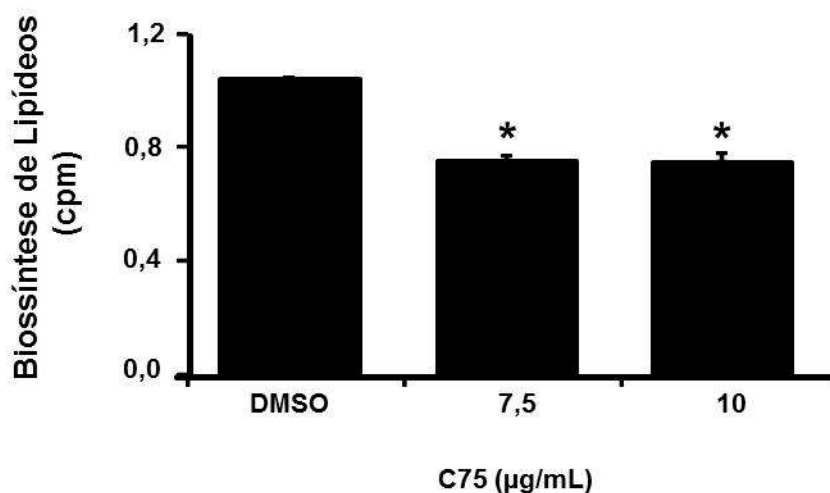


Fig. 9: O tratamento com C75 reduziu a atividade de FASN. As células B16-F10 foram tratadas com 7,5 e 10 µg/mL de C75 por 6 h. Lipogênese foi quantificada através da incorporação de ¹⁴C-acetato. Os valores representam a média ± EPM de 3 experimentos distintos; *cpm*: counts per minute; **p*<0,05, C75 versus DMSO, teste *t* de Student.

Para caracterizar de que maneira a inibição de FASN reduz a proliferação de células de melanoma B16-F10, foram analisados os efeitos de C75 sobre o conteúdo de diversas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular. Vale ressaltar que as células

utilizadas nas análises de ciclo celular foram coletadas simultaneamente com as células utilizadas para a obtenção de cada extrato estudado.

A primeira proteína analisada foi a própria FASN. Apesar da maior inibição da proliferação, nas células de melanoma B16-F10, ter sido alcançada com o tratamento de 12 h, o conteúdo de FASN apresentou uma redução de apenas 7% em relação ao controle (**Fig. 10**).

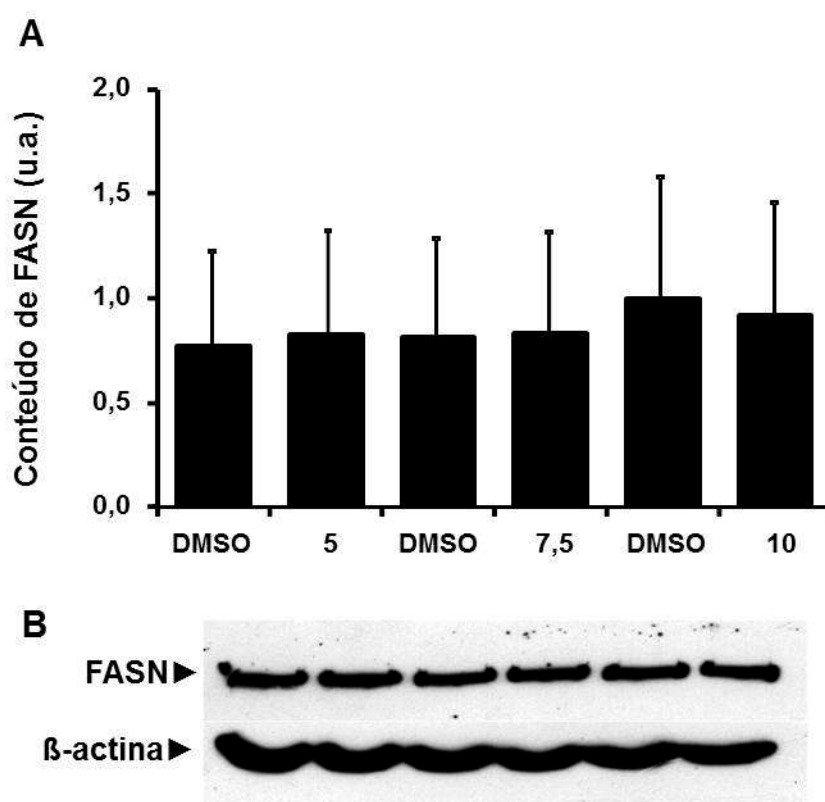


Fig. 10: Efeitos do tratamento de células B16-F10 com C75 sobre o conteúdo de FASN. As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com diferentes concentrações de C75 por 12 h. Em seguida, foram realizados Western blottings para checagem do conteúdo de FASN (1:3.000), normalizado pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos. Imagem representativa encontra-se abaixo do gráfico.

As proteínas supressoras de tumor p21^{WAF1/Cip1} e p27^{kip1} mostraram alterações em seus conteúdos após o tratamento com C75. Pôde-se observar um aumento de 50% do conteúdo de p21^{WAF1/Cip1} após o tratamento com 10 µg/mL de C75 (**Fig. 11 A**). Já a proteína p27^{kip1} mostrou aumento de 54% após o tratamento com 10 µg/mL de C75 (**Fig. 11 B**). Por outro lado, proteína Skp2, responsável pela degradação proteossômica de p27^{kip1}, mostrou-se reduzida em 9% (**Fig. 11 C**). [Li et al. \(2004\)](#) mostraram a relação inversa de p27^{kip1} e Skp2 em amostras de melanoma e nevos melanocíticos, associando esta inversão a uma maior agressividade tumoral.

Paralelamente, foi observado aumento dos níveis das ciclinas D1 e E, mas estes foram estatisticamente significativos somente nas menores concentrações testadas (**Fig. 12**).

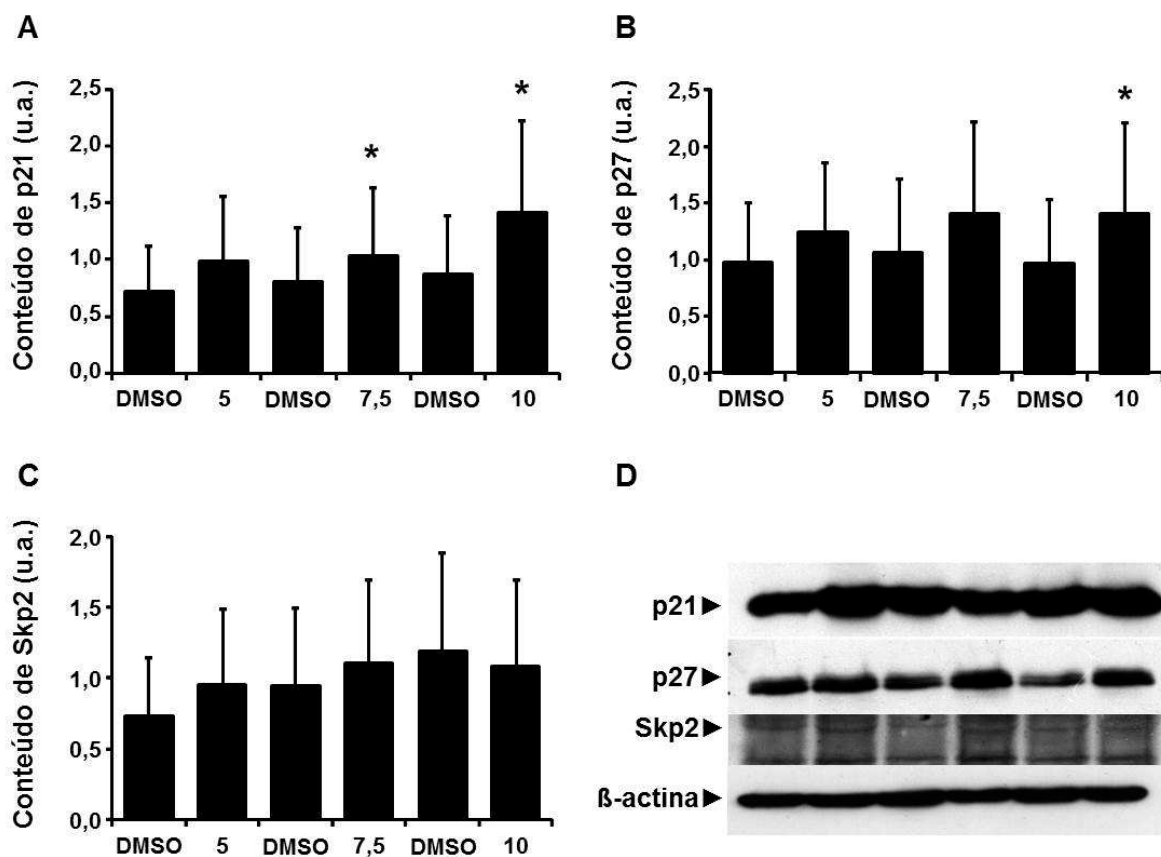


Fig. 11: Efeitos do tratamento de células B16-F10 com C75 sobre o conteúdo de p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1} e Skp2. As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com concentrações crescentes de C75, por 12 h. Em seguida, foram realizados Western blottings para checagem do conteúdo de p21^{WAF1/Cip1} (1:200; **A**), p27^{Kip1} (1:500; **B**) e Skp2 (1:1.000; **C**), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, C75 *versus* DMSO, teste *t* de Student. Em **D** estão às imagens representativas de cada proteína.

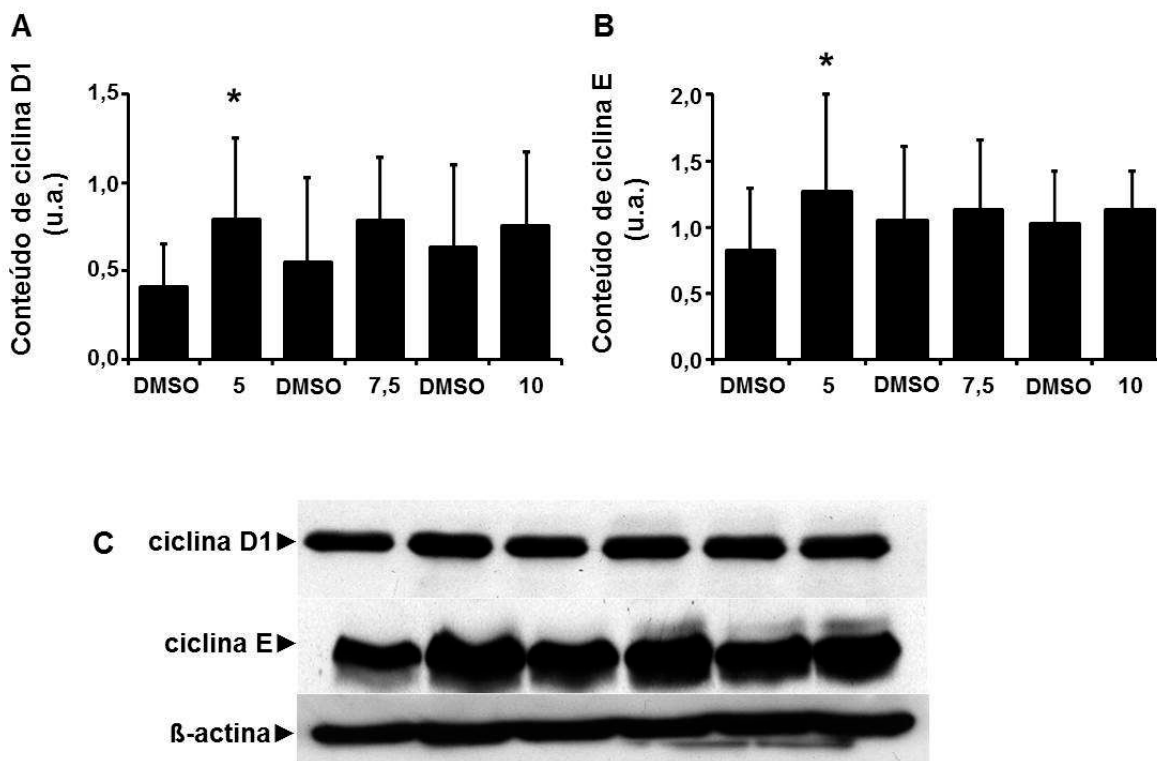


Fig. 12: Efeitos do tratamento de células B16-F10 com C75 sobre o conteúdo de ciclinas D1 e E. As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com concentrações crescentes de C75, por 12 h. Em seguida foram realizados Western blottings para checagem do conteúdo de ciclina D1 (1:200; **A**) e E (1:500; **B**), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, C75 versus DMSO, teste *t* de Student. Em **C** estão às imagens representativas de cada proteína.

Dentre as cdk's estudadas, foi observada significativa redução de 22% apenas de cdk2 nas células tratadas com 10 µg/mL de C75, em relação às células controle (**Fig. 13**). A redução nos níveis de cdk2 está diretamente associada à inibição da proliferação, já que esta cdk participa ativamente da progressão das fases G0/G1 para S do ciclo celular. Não foram observadas alterações nos níveis de cdk4 e cdk6 após inibição de FASN com C75.

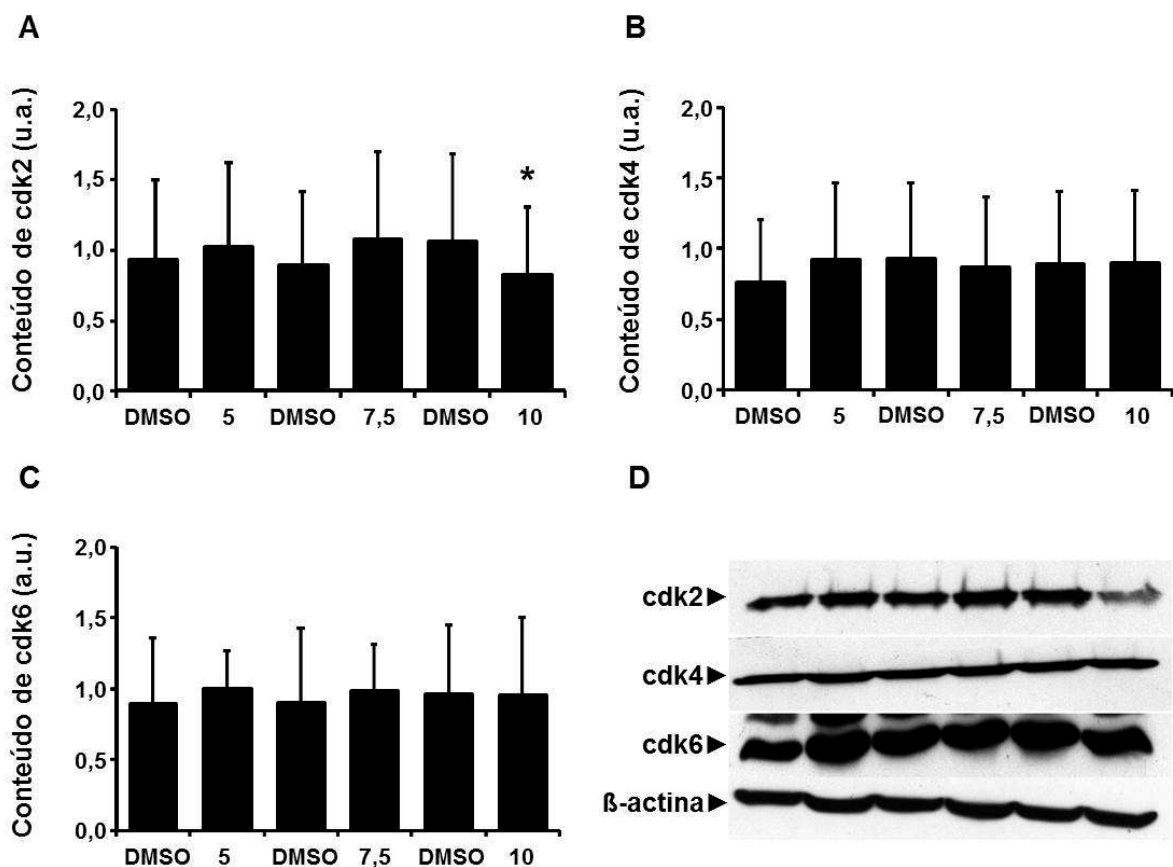


Fig. 13: Efeitos do tratamento de células B16-F10 com C75 sobre o conteúdo de cdk2, cdk4 e cdk6. As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com concentrações crescentes de C75, por 12 h. Em seguida foram realizados Western blottings para checagem do conteúdo de cdk2 (1:30.000; **A**), cdk4 (1:50.000; **B**) e cdk6 (1:500; **C**), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, C75 *versus* DMSO, teste *t* de Student. Em **D** estão as imagens representativas de cada proteína.

Após verificar os efeitos do tratamento com C75 sobre a proliferação de células B16-F10 em cultura, foram verificados os efeitos da inibição de FASN em animais portadores de melanomas intraperitoneais. Utilizamos camundongos C57Bl/6 inoculados com $2,5 \times 10^5$ células B16-F10 suspensas em PBS tamponado, tratados semanalmente com 20 mg/kg de peso corporal de C75 ou somente o veículo (20% DMSO/80% PBS) (Pizer *et al.*, 2000; Horiguchi *et al.*, 2008). Quatorze dias após a inoculação das células tumorais, os animais foram sacrificados e os tumores foram coletados e processados para Western blottings.

Os animais não apresentaram alterações físicas ou comportamentais durante os 10 primeiros dias após a inoculação das células B16-F10 na cavidade peritoneal. Entretanto, após este período, foi possível observar aumento de volume do abdômen. A **Fig. 14** mostra dois camundongos C57Bl/6 logo após o sacrifício, com as cavidades peritoneais expostas, nas quais se observa a presença de massa tumoral de coloração enegrecida e consistência mole à gelatinosa que se localiza, em grande parte, no local do inóculo. Os tumores primários ocupam grande parte da cavidade peritoneal, crescendo de maneira mais localizada no grupo controle (DMSO - **A**), e de maneira mais difusa no grupo tratado (C75 - **B**).

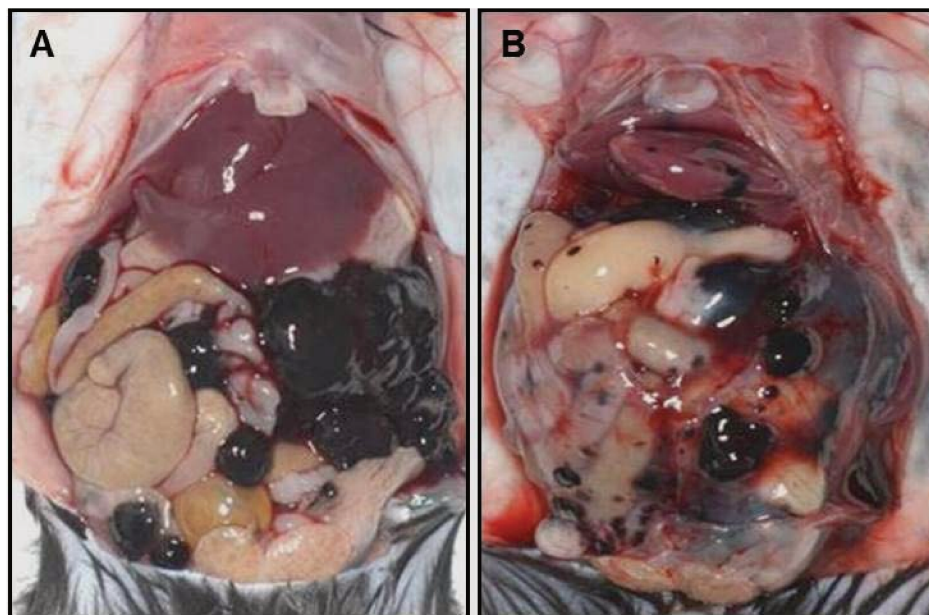


Fig. 14: Modelo de tumorigênese de melanoma em camundongos C57Bl/6. Em **A**, observa-se animal do grupo controle, que recebeu tratamento somente com DMSO, com tumor primário relativamente delimitado e ocupando grande parte da cavidade peritoneal. Em **B** podemos notar, por toda cavidade peritoneal, o aspecto fragmentado e difuso do tumor primário de um camundongo tratado com 20 mg/kg de peso corporal por semana de C75.

Seguindo a mesma sequência avaliada *in vitro*, foram verificados inicialmente os índices de proliferação celular nos animais portadores de melanoma. Para isso, os camundongos foram inoculados com 10 mM de solução de BrdU (BD Pharmigen) intraperitonealmente, 2 h antes do sacrifício, de acordo com as instruções do fabricante. Após o sacrifício, os tumores primários intraperitoneais foram coletados, fixados e então processados para os cortes histológicos, nos quais as reações foram realizadas. Conforme verificado na **Fig. 15**, os animais tratados com C75 mostraram 15% a menos de marcação com BrdU do que os animais controle (DMSO), refletindo redução a proliferação celular após inibição de FASN.

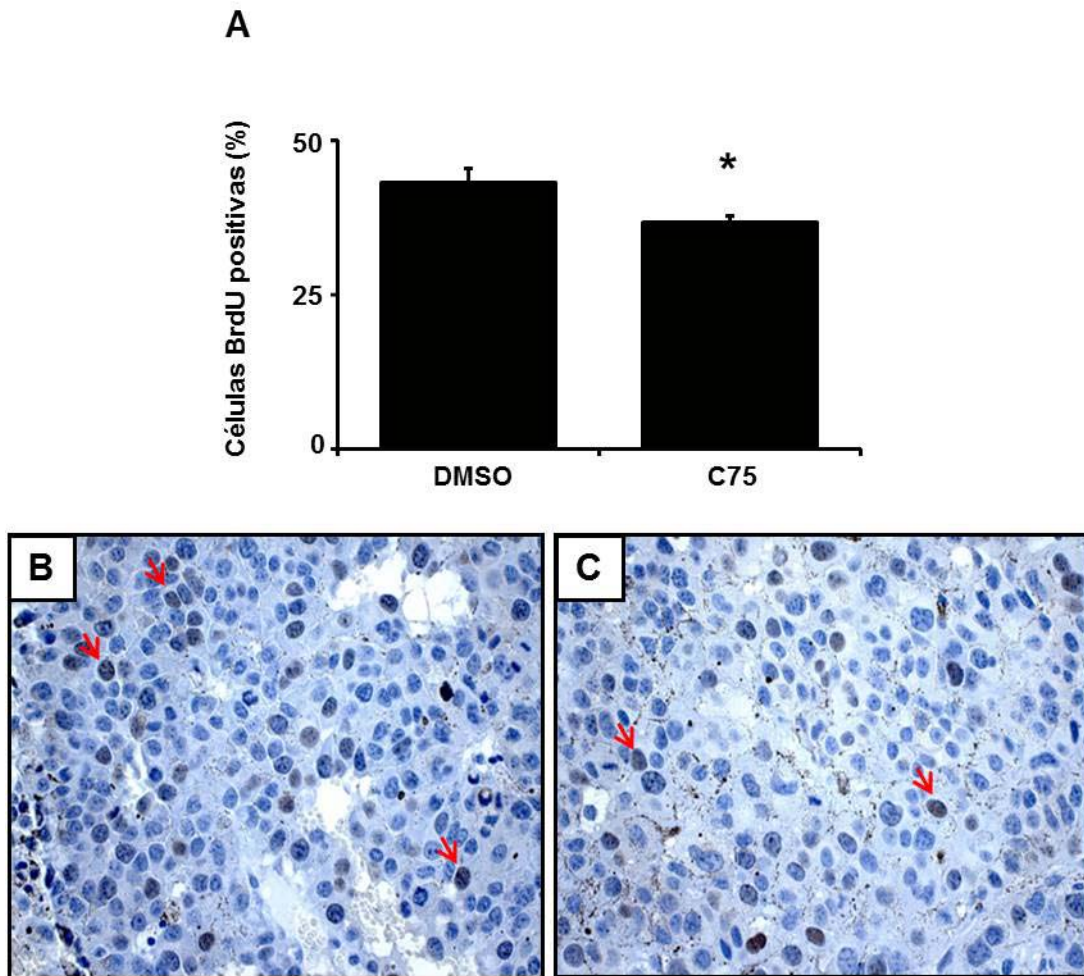


Fig. 15: O tratamento com C75 reduziu a proliferação celular *in vivo*. Camundongos C57Bl/6 portadores de melanoma foram tratados semanalmente com DMSO (grupo controle) ou com 20 mg/kg de peso corporal de C75 (grupo tratado). Após 14 dias, os tumores intraperitoneais foram coletados, fixados em formol tamponado 10%, processados e cortes em parafina de 3 μ M foram realizados. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário contra BrdU e após secundário foi realizada revelação com DAB e contra-coloração com hematoxilina de Carazzi. As células foram contadas com auxílio do programa ImageJ. Células com núcleos acastanhados foram consideradas positivas (**setas**). Imagens com aumento de 400x representativas da marcação celular correspondentes ao controle (**DMSO**) em **B** e ao tratado (**C75**) em **C**. Em **A** nota-se a diminuição das células em proliferação quando comparado com o controle. Os valores representam a média \pm EPM de 10 animais separados de forma randomizada em grupo controle (DMSO) e grupo tratado (C75); * $p < 0,05$, C75 versus DMSO, teste *t* de Student.

Em seguida foram avaliadas as taxas de apoptose *in vivo*, através de reações de TUNEL em cortes histológicos, utilizando kit comercial da Roche (Suíça) e seguindo as instruções do fabricante. O número de células em apoptose, ie, TUNEL positivas, identificadas por seus núcleos picnóticos de coloração verde com fluorescência brilhante, foi cerca de 5x maior nos cortes dos tumores dos animais tratados semanalmente com C75, quando comparado aos cortes dos tumores controle (**Fig. 16**).

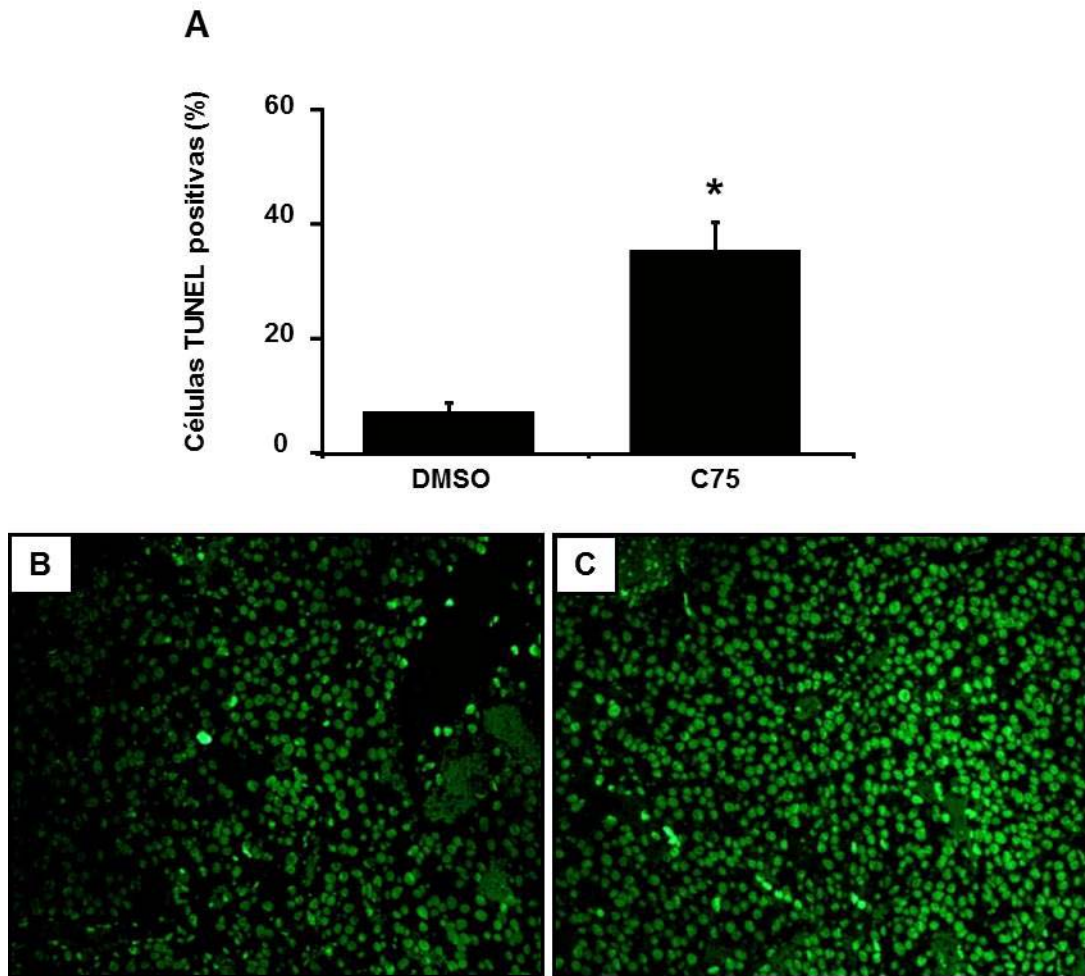


Fig. 16: O tratamento *in vivo* com C75 aumentou o número de células tumorais em apoptose. Camundongos C57Bl/6 portadores de melanoma foram tratados semanalmente com DMSO (grupo controle) ou com 20 mg/kg de peso corporal de C75 (grupo tratado). Após 14 dias, os tumores intraperitoneais foram coletados, fixados em formol tamponado 10%, processados e cortes em parafina de 3 μ M foram realizados. As lâminas foram incubadas com solução de DNase para abertura das cadeias de DNA e com marcador de extremidades 3' e 5' de DNA. As células foram contadas com auxílio do programa Image J. Imagens com aumento de 200x representativas da marcação celular correspondentes ao controle (**DMSO**) em **B** e ao tratado (**C75**) em **C**. Em **A** nota-se, no tratado, aumento da intensidade de fluorescência nas células tumorais quando comparada com o controle. Os valores representam a média \pm EPM de 40 animais separados de forma randomizada em grupo controle (DMSO) e grupo tratado (C75); * $p < 0,05$, C75 *versus* DMSO, teste *t* de Student.

Tendo em vista que o tratamento com C75 reduziu a proliferação e induziu apoptose das células de melanoma *in vivo*, o passo seguinte foi analisar as mesmas proteínas envolvidas na transição das fases G0/G1 para S do ciclo celular, verificadas nas células em cultura. Diferentemente do verificado *in vitro*, houve uma significativa redução de 40% do conteúdo de FASN nos tumores dos animais tratados com C75 em relação aos animais tratados apenas com o veículo, DMSO (Fig. 17).

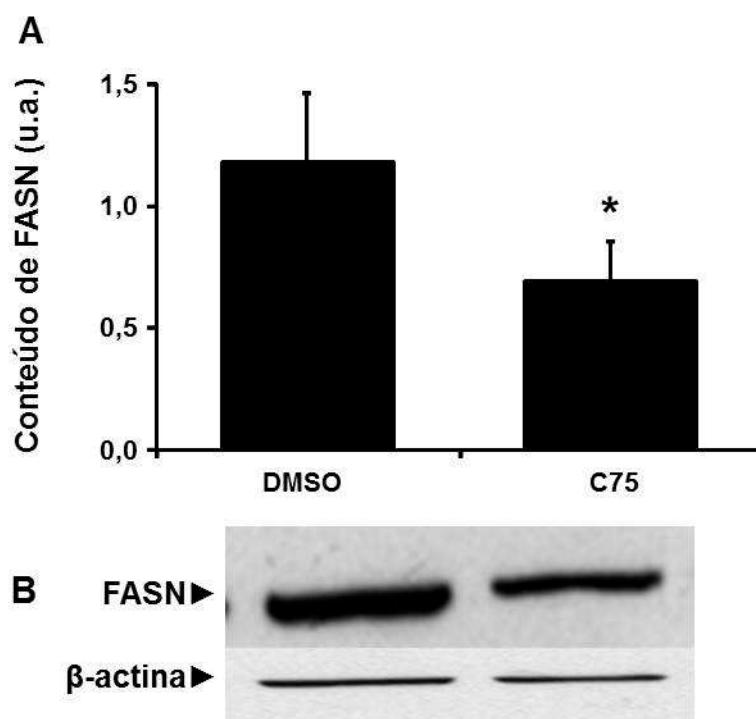


Fig. 17: O tratamento com C75 reduziu os níveis de FASN em modelo animal de melanoma. Os tumores foram coletados e preparados para Western blottings para checagem do conteúdo de FASN (1:3.000), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média \pm EPM (n=20); * $p < 0,05$, C75 versus DMSO, teste *t* de Student. Imagem representativa da proteína encontra-se abaixo do gráfico.

Aumentos de cerca de 40% foram observados para as proteínas p21^{WAF1/Cip1} e p27^{Kip1} nos animais tratados com C75, em relação aos controles, sem alteração no conteúdo de Skp2, responsável pela ubiquitinação de p27^{Kip1} (Fig. 18).

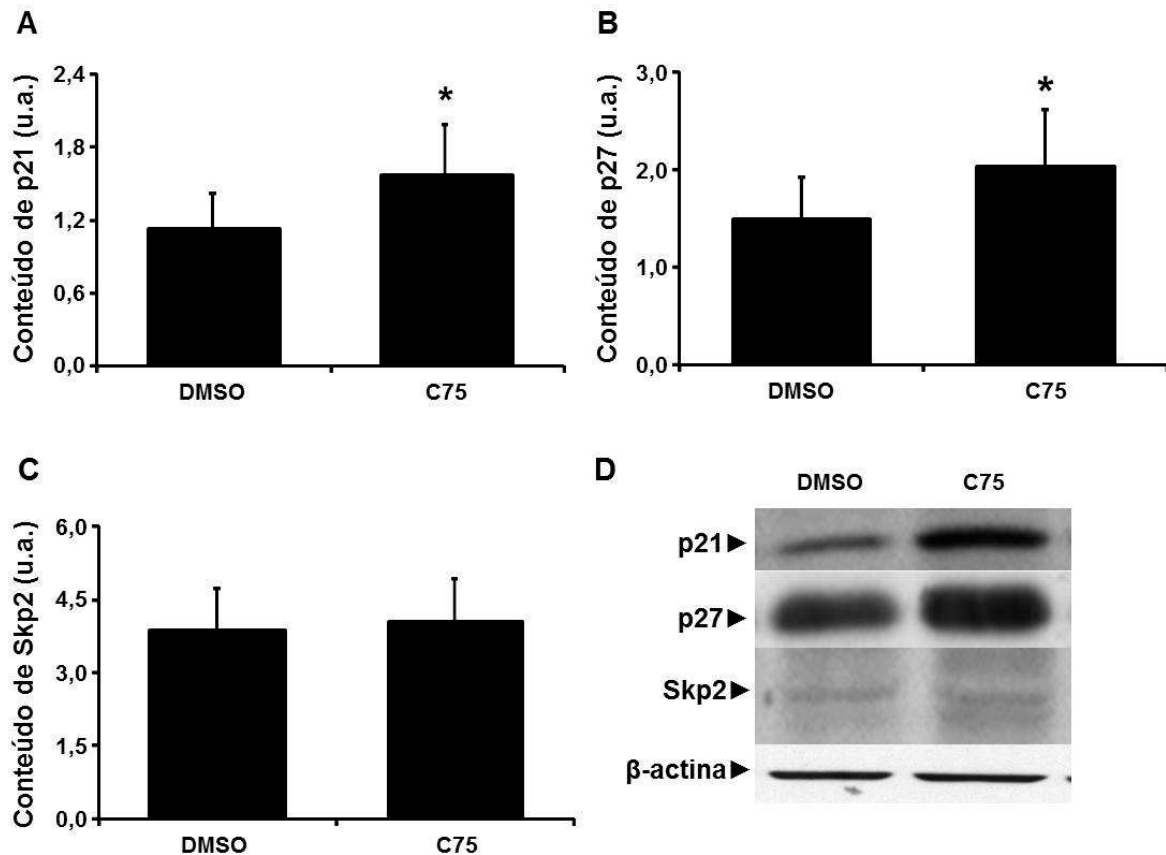


Fig. 18: O tratamento com C75 em modelo animal de melanoma elevou os níveis de p21^{WAF1/Cip1} e p27^{Kip1}, mas não de Skp2. Os tumores foram coletados e preparados para Western blottings para checagem do conteúdo de p21^{WAF1/Cip1} (1:200; **A**), p27^{Kip1} (1:500; **B**) e Skp2 (1:1.000; **C**), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média ± EPM (n=20); **p*<0,05, C75 versus DMSO, teste *t* de Student. Em **D** estão as imagens representativas de cada proteína.

O tratamento dos animais portadores de melanoma com C75 aumentou em 50% o conteúdo de ciclina D1, em relação aos controles (**Fig. 19 A**). De maneira semelhante ao que observamos *in vitro* para cerulenina (Ortega, 2010), os níveis de ciclina E não foram alterados *in vivo*, após tratamento com inibidor de FASN (**Fig. 19 B**). Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis das cdk-2, -4 e -6 após tratamento dos animais com C75 (**Fig. 20**).

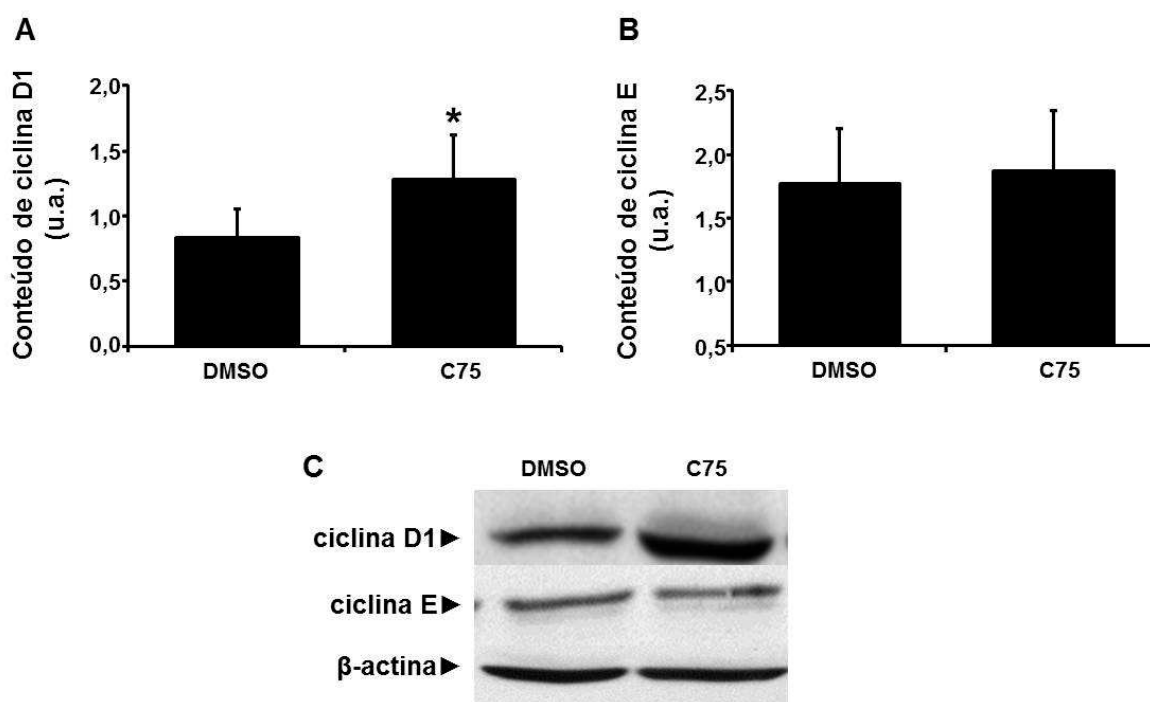


Fig. 19: Níveis de ciclinas D1 e E após tratamento *in vivo* com C75 em modelo animal de melanoma. Os tumores foram coletados e preparados para Western blottings para checagem do conteúdo de ciclina D1 (1:200; **A**) e E (1:500; **B**), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média \pm EPM ($n=20$); * $p<0,05$, C75 versus DMSO, teste *t* de Student. Em **C** estão as imagens representativas de cada proteína.

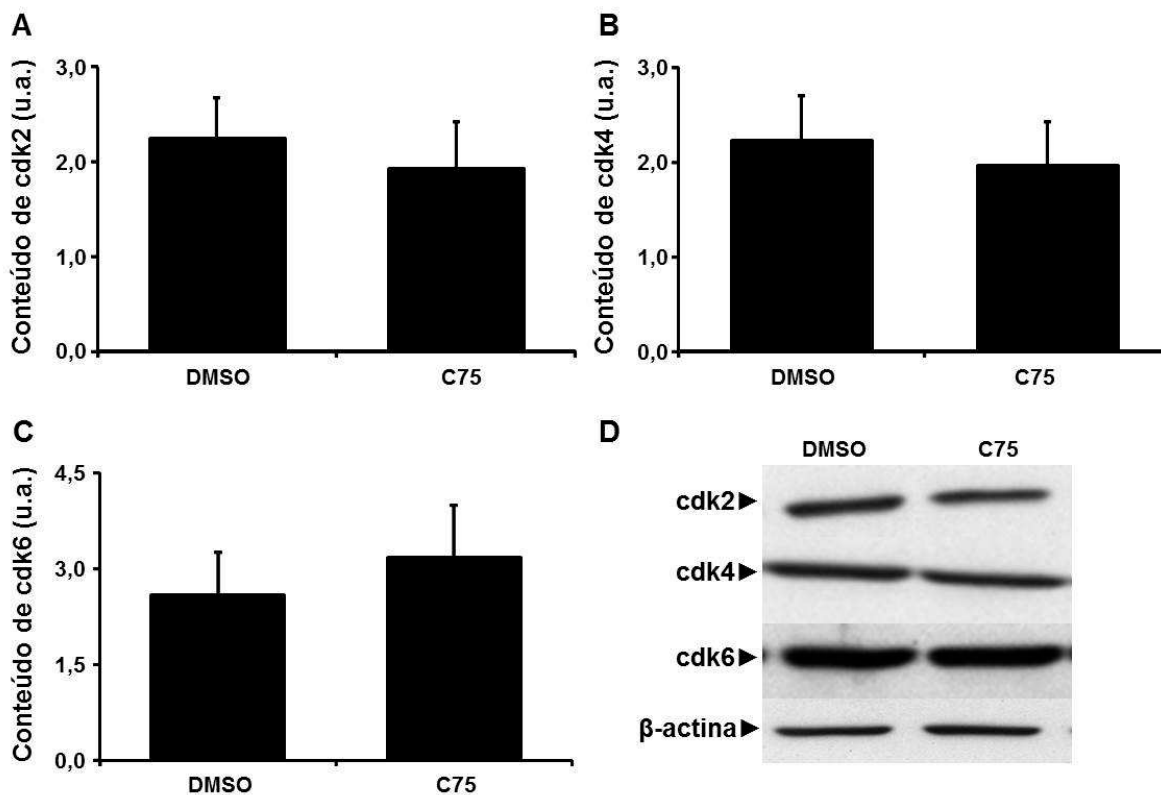


Fig. 20: O tratamento com C75 em modelo animal de melanoma não alterou o conteúdo de cdk2, cdk4 e cdk6. Os tumores foram coletados e preparados para Western blottings para checagem do conteúdo de cdk2 (1:30.000; **A**), cdk4 (1:50.000; **B**) e cdk6 (1:500; **C**), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média \pm EPM (n=20); * p <0,05, C75 versus DMSO, teste t de Student. Em **D** estão as imagens representativas de cada proteína.

Para avaliarmos o potencial anti-tumoral de C75 em melanomas murinos, seguiu-se com a mensuração da formação e tamanho de tumores subcutâneos. Vinte camundongos foram inoculados no dorso com $2,5 \times 10^5$ células B16-F10 juntamente com Matrigel[®], na proporção de 1:1. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupo controle (20% DMSO/80% PBS1x) e grupo tratado com C75 (30 mg/kg, semanal). Os animais foram avaliados diariamente e as dimensões dos tumores foram determinadas com auxílio de um paquímetro 2 vezes por semana. Os animais foram pesados, anestesiados e os

tumores foram mensurados. O volume dos tumores foi expresso em mm^3 e calculado pela seguinte fórmula $V=0,5 \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$ de acordo como descrito por [Colleta et al. \(2004\)](#).

A literatura relata anorexia e perda de peso como efeitos citotóxicos do C75 ([Pizer et al. 2000](#); [Relat et al., 2012](#)), por isso os animais foram pesados juntamente com cada medida tumoral. Observa-se que os animais do grupo controle (**DMSO**) apresentaram ganho de peso mais significativo durante o acompanhamento do desenvolvimento tumoral, do que os animais de grupo tratado (**C75**), os quais praticamente mantiveram seu peso inicial (**Fig. 21 A**). O acompanhamento dos animais por quatro semanas, após a inoculação das células B16-F10 no dorso dos animais e tratamentos semanais, mostrou que os animais do grupo tratado tiveram tumores cerca de 2,7x menor do que os tumores dos animais controle (**Figs. 21 B e C**).

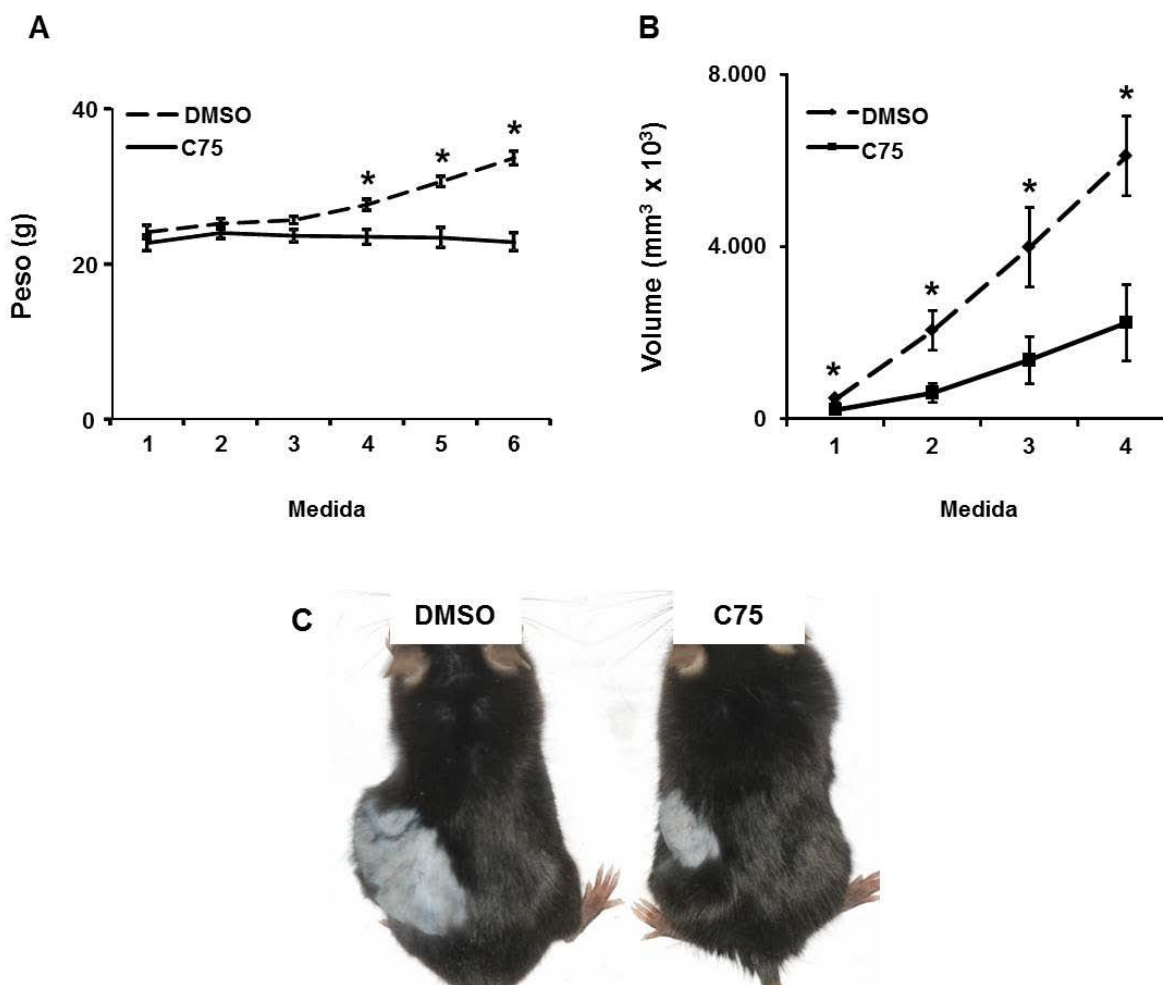


Fig. 21: Modelo de formação tumoral no dorso de animais C57Bl/6. Em **C** observa-se animal representante do grupo controle (**DMSO**), apresentando tumor bem delimitado e de grande proporção e animal representante do grupo tratado (**C75**), com tumor de menor dimensão. Os valores representam a média \pm EPM de 40 animais separados de forma randomizada em grupo controle (DMSO) e grupo tratado (C75); * $p < 0,05$, C75 *versus* DMSO, teste *t* de Student.

Resumindo os dados mostrados até esse momento, pode-se concluir que o tratamento *in vitro* e *in vivo* com C75 reduz a proliferação das células de melanoma B16-F10, bem como induz a morte celular por apoptose. Apesar da redução da atividade enzimática de FASN após tratamento com C75, verificamos a especificidade de nossos achados após silenciamento de FASN com siRNA.

As células B16-F10 foram plaqueadas e transfectadas conforme descrito por [Carvalho *et al.* \(2008\)](#) e [Zecchin *et al.* \(2010\)](#). Cerca de 48 h após as transfecções, as células foram coletadas, para determinação da porcentagem das células em cada fase do ciclo celular e obtenção de extratos protéicos para realização de Western blottings para FASN, p21^{WAF1/Cip1}, p27^{kip1}, cdk2 e Skp2. O êxito na metodologia utilizada para silenciar FASN com RNA de interferência (RNAi) pôde ser confirmado pela redução significativa de aproximadamente 80% dos níveis de FASN (**Fig. 22**). A inibição de FASN resultou em inibição da proliferação das células B16-F10, pela redução de 30% de células na fase S do ciclo celular (**Fig. 22 C**). Essa redução da proliferação foi acompanhada por aumento nos níveis de p21^{WAF1/Cip1} e p27^{kip1}, assim como redução de cdk2 e Skp2 (**Fig. 23**), confirmando que a proliferação de células de melanoma é dependente de FASN e que as alterações verificadas nas proteínas do ciclo celular descritas anteriormente ocorrem em consequência de sua inibição enzimática.

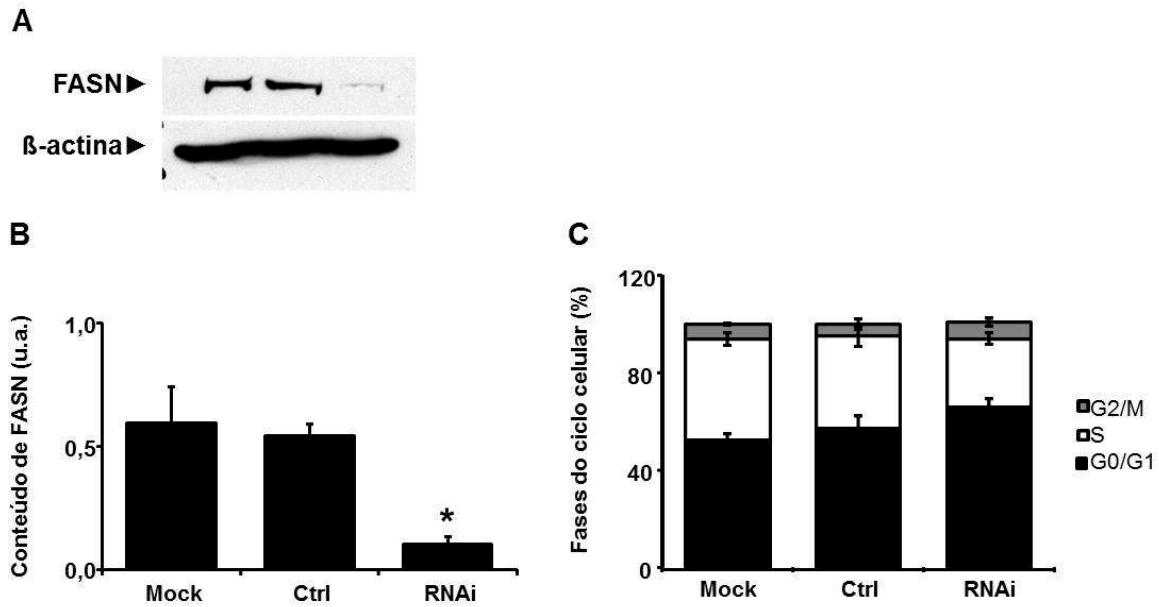


Fig. 22: Silenciamento de FASN e proliferação celular nas células B16-F10. As células B16-F10 foram plaqueadas, transfectadas com oligos anti-FASN por 4 h e coletadas após 48 h. Em seguida, foram realizados Western blottings para checagem do conteúdo de FASN (1:3.000; **A**). Em **C** verifica-se a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular, determinadas em citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo. Os valores representam a média \pm EPM de 2 experimentos distintos; * $p < 0,05$, RNAi *versus* controle, teste *t* de Student.

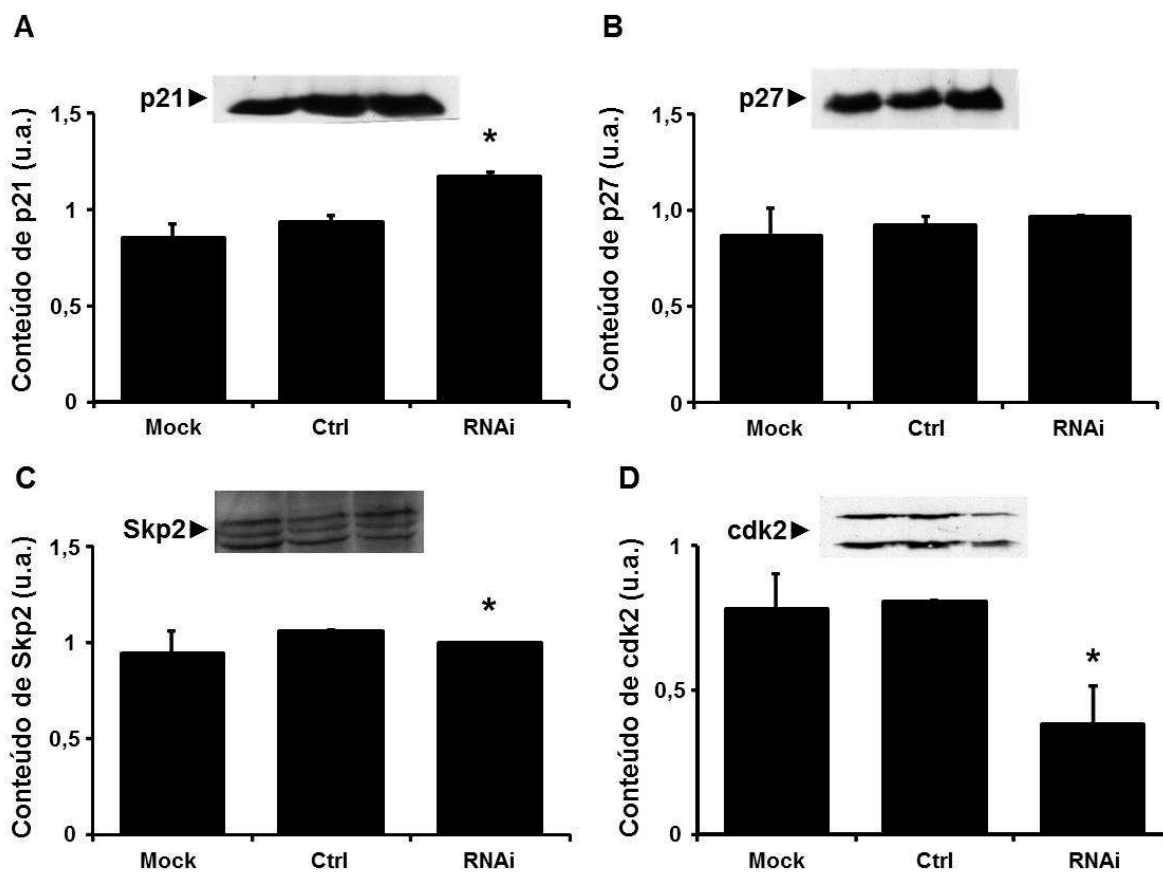


Fig. 23: Efeitos do silenciamento de FASN sobre o conteúdo de p21^{WAF1/Cip1}, p27^{kip1}, Skp2 e cdk2. As células B16-F10 foram plaqueadas, transfectadas com oligos anti-FASN por 4 h e coletadas após 48 h. Em seguida, foram realizados Western blottings para checagem do conteúdo de p21 (1:200; **A**), p27 (1:500; **B**), Skp2 (1:1.000; **C**) e cdk2 (1:30.000; **D**). Os valores representam a média \pm EPM de 2 experimentos distintos; * $p < 0,05$, RNAi *versus* Controle, teste *t* de Student.

6 DISCUSSÃO

Aumento da expressão e atividade da enzima FASN foram detectados em diversos tumores, contribuindo para os altos índices proliferativos das células tumorais (Milgraum *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; Krontiras *et al.*, 1999; Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Piyathilake *et al.*, 2000; Nemoto *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002; Swinnen *et al.*, 2002; Innocenzi *et al.*, 2003; Takahiro *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2003; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Kapur *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2006). Desse modo, a inibição farmacológica da enzima FASN é seletivamente citotóxica para as células neoplásicas, resultando em inibição da progressão do ciclo celular, com significativa redução da proliferação e aumento das taxas de apoptose, e sugerindo forte correlação entre a atividade de FASN e o controle do ciclo celular (Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005b; Menendez *et al.*, 2007).

Melanoma murino tem sido usado por nosso grupo há alguns anos, quando o Prof. Edgard Graner buscou um modelo experimental de metástases espontâneas, proposto pelo Prof. Sílvio S. Veiga (Departamento de Biologia Celular, UFPR) em sua tese de doutoramento realizada no instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, em São Paulo (Veiga *et al.*, 1997). Previamente mostramos que o tratamento de camundongos portadores de melanomas intraperitoneais com orlistat reduziu em 50% o número de metástases espontâneas para os linfonodos mediastínicos (Carvalho *et al.*, 2008). Em seguida, mostramos que a inibição farmacológica de FASN, com cerulenina ou orlistat, nessas células B16-F10 ativa a via intrínseca da apoptose, mediada pela liberação de citocromo c a partir das mitocôndrias, seguida por ativação de caspases-9 e -3. 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 *et al.*, 2010). Demonstramos também que as mitocôndrias de células B16-F10 tratadas com orlistat mostram significativa redução na quantidade de ácido palmítico e de seus produtos de alongação e dessaturação, tais como ácidos araquidônico, behênico e oléico, respectivamente, através de espectrometria de massa (*electrospray ionization mass spectrometry*, ESI-MS) (Zecchin *et al.*, 2011).

Apesar dos dados da literatura e da história prévia de nosso grupo sugerirem fortemente a participação de FASN na proliferação e sobrevivência de fibroblastos (Almeida *et al.*, 2005), células endoteliais (Seguin *et al.*, 2012), células linfáticas (Bastos, 2012), melanócitos murinos (Rossato, 2011), células de carcinoma espinocelular de boca (Agostine *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004), melanoma murino (Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin *et al.*, 2010; Zecchin *et al.*, 2011), não se sabe ainda quais os mecanismos envolvidos nesses processos. Desse modo, o principal objetivo deste trabalho foi analisar de que maneira a inibição de FASN age sobre o ciclo celular.

O primeiro passo foi verificar se outro agente inibidor de FASN, no caso C75, também resultaria em inibição da proliferação de células B16-F10, uma vez que já havíamos trabalhado com o orlistat (Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin *et al.*, 2010; Zecchin *et al.*, 2011) e levando em consideração que cerulenina só pode ser utilizada *in vitro* devido sua alta instabilidade (Omura, 1976; Loftus *et al.*, 2000). Sendo assim, verificamos em células B16-F10 e em animais portadores de melanoma menores índices de proliferação das células neoplásicas após o uso de C75, assim como previamente demonstrado em carcinoma espinocelular de boca, células de melanoma (A-375), entre outras, incluindo as próprias B16-F10 tratadas com orlistat (Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005b; Ho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).

Essa redução do número total de células poderia ser decorrente de morte celular e/ou de uma parada no ciclo. Desse modo, ensaio de MTT *in vitro* mostrou aumento da inviabilidade celular após tratamento com C75, sendo que a inibição de FASN elevou significativamente os índices de células em apoptose positivamente marcadas com Anexina V (*in vitro*) ou pelo método de TUNEL (*in vivo*). Anteriormente mostramos que a inibição de FASN com cerulenina ou orlistat nas células B16-F10 não resulta em necrose nem autofagia (Zecchin *et al.*, 2010), mas somente em apoptose, assim como C75 aqui verificado, sendo que morte por apoptose já foi previamente mostrada em outras linhagens tumorais, utilizando diferentes inibidores da enzima FASN (Menendez *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2007; Dowling *et al.*, 2009). Aumento de células TUNEL positivas foi previamente demonstrado *in vitro*, em células de câncer de mama MCF-7, após silenciamento de FASN (Bandyopadhyay *et al.*, 2006), e em metástases hepáticas de animais BALB/C inoculados com células de cólon 26, tratadas com cerulenina (Murata *et al.*, 2010).

Uma vez que a inibição de FASN reduz a proliferação de diversas linhagens tumorais, justamente por inibir a síntese de ácidos graxos necessários à síntese de membranas (Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Chirala *et al.*, 2003, Menendez *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2010), procuramos verificar as alterações na progressão do ciclo celular após o tratamento com C75. Tendo como base a literatura que mostra diferenças na redistribuição das células no ciclo celular de acordo com o tempo de tratamento (Li *et al.* 2001), testamos diferentes tempos de inibição de FASN *in vitro*. O tratamento por 8 ou 24 h com C75 não resultou em inibição significativa da proliferação celular, enquanto que o tratamento por 12 h inibiu em 63 e 77% a proliferação das células B16-F10 tratadas com 7,5 e 10 µg/mL, respectivamente. Sendo assim verificamos que o

tratamento com C75 promoveu uma redução de células tumorais na fase S do ciclo celular, com acúmulo em G0/G1 e um leve aumento em G2/M *in vitro*.

Utilizamos a marcação para BrdU, um análogo sintético da timidina, para o estudo da proliferação *in vivo*, e observamos uma redução de 15% da proliferação de células B16-F10 em animais tratados semanalmente com 20 mg/kg de C75 em relação aos animais controle (DMSO). Anteriormente, foi demonstrado que a superexpressão de FASN em células iPrEC (células epiteliais da próstata) confere uma vantagem proliferativa em termos de porcentagem destas células incorporando BrdU_([Migita et al., 2009](#)). De modo semelhante, também foi demonstrada inibição da proliferação de acordo com a incorporação de BrdU em células MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-435 tratadas com outro inibidor de FASN, orlistat, por 72 h ([Knowles et al., 2004](#)).

Nossos dados sugerem, portanto, que a inibição de FASN primeiramente resulta em inibição da proliferação, para posteriormente induzir apoptose nas células de melanoma B16-F10, verificada após 48 h de tratamento com C75. As diferenças entre inibição da proliferação e apoptose podem ser explicadas pela ordem dos acontecimentos diante da inibição da enzima FASN. Segundo Menendez e Lupu, o primeiro efeito da inibição de FASN é a parada do ciclo celular com diminuição da proliferação tumoral, e só posteriormente há apoptose ([Menendez e Lupu, 2007](#)). De acordo com essa afirmação, Pizer e colaboradores analisaram a incorporação de timidina ao DNA após a inibição de FASN com cerulenina e C75 em algumas linhagens de células de carcinoma de cólon e de leucemia. Os resultados mostraram inibição da replicação do DNA após 2 h de tratamento, enquanto a fragmentação cromossomal, um sinal característico da apoptose, não foi detectada antes de 6 h de exposição aos inibidores de FASN ([Pizer et al., 1998](#)).

Analizamos, por Western blotting, os efeitos da inibição de FASN sobre algumas proteínas envolvidas na transição das fases G0/G1 para S do ciclo celular, já que os resultados mostraram acúmulo de células nas fases G0/G1. A primeira proteína analisada foi a própria FASN. Apesar da maior inibição da proliferação, nas células de melanoma B16-F10, ter sido alcançada com o tratamento de 12 h, o conteúdo de FASN apresentou uma redução de apenas 7% em relação ao controle. A não alteração no conteúdo da proteína FASN, após o tratamento com C75 já foi relatada na literatura por Relat e colaboradores (1998), quando avaliaram os efeitos da inibição de FASN com C75 em células de adenocarcinoma de pulmão (A549). É possível também que a esperada redução não tenha sido detectada em cultura pela própria meia-vida de FASN ser de cerca de 12,5 h (Graner *et al.*, 2004). No entanto, o tratamento dos animais portadores de melanoma com C75 reduziu em 40% o conteúdo de FASN, neste sentido a literatura mostra redução dos níveis protéicos associada à redução da atividade enzimática (Li *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).

O primeiro complexo formado com a finalidade de fosforilar a proteína Rb e dar início ao processo de progressão do ciclo celular é constituído por ciclina D/cdk4/cdk6 e, neste momento, p21^{WAF1/Cip1} e p27^{Kip1} são co-fatores positivos para a progressão do ciclo celular afetando a atividades das ciclinas D, E e A (Li *et al.*, 2006; Masamha, 2009; van Riggelen e Felsner, 2010). Aumento significativo de p21^{WAF1/Cip1} foi verificado tanto nas células de melanoma B16-F10 tratadas com C75 em cultura, quanto nos tumores dos animais tratados. Esses resultados se assemelham com os nossos de mestrado (Ortega, 2010), quando utilizamos cerulenina como inibidor de FASN, assim como demonstrado em células RKO, de câncer de cólon (Li *et al.*, 2001) e em células A-375, de melanoma humano (Ho *et al.*, 2007), resultando em menor proliferação. Houve também aumento

significativo da proteína supressora de tumor p27^{Kip1} *in vitro* e *in vivo* após inibição de FASN, apesar dos níveis de Skp2, envolvida diretamente na ubiquitinação e degradação de p27^{Kip1} (Li *et al.*, 2006), não terem sido alterados *in vivo*. *In vitro*, porém, houve uma redução significativa de Skp2, conforme verificado previamente em nosso grupo em células B16-F10 tratadas com orlistat (Carvalho *et al.*, 2008).

Em nosso trabalho de mestrado, apesar de não ter ocorrido aumento dos níveis totais de p27^{Kip1}, o tratamento com cerulenina resultou em aumento do conteúdo de p27^{Kip1} co-imunoprecipitado com cdk2 (Ortega, 2010). Assim, o aumento do conteúdo desta proteína ligada a cdk2 demonstra que a inibição de FASN ativa mecanismos pontuais de combate à proliferação desordenada das células de melanoma B16-F10, por exemplo, a ativação de p27^{Kip1}, um como co-fator negativo, agindo no segundo complexo, através da ligação a cdk2, e assim bloqueando a progressão do ciclo celular.

O tratamento com C75 aumentou os níveis das ciclinas D1 nos animais tratados e nas células, mas estas somente na menor concentração de C75 testada. Os níveis de ciclina E, cdk4 e 6 permaneceram inalterados *in vitro* e *in vivo*, no entanto, cdk2 mostrou reduzido conteúdo nas células tratadas e uma tendência a níveis menores nos animais inoculados com C75. Da mesma forma, em nosso trabalho de mestrado, cerulenina não alterou o conteúdo das ciclinas D1, E, cdk4 e cdk6, mas reduziu o conteúdo de cdk2 (Ortega, 2010).

A especificidade de nossos achados foi confirmada de duas maneiras: (1) pela medida da atividade enzimática de FASN através de ensaio de lipogênese e, (2) após o silenciamento de FASN com RNAi.

As células foram tratadas por um curto período de tempo (6 h) justamente para verificamos se os demais resultados observados após o uso do inibidor por 12 h ou mais

seriam decorrentes da real inibição da atividade de FASN. De fato, o tratamento das células B16-F10 com C75 por apenas 6 h foi capaz de inibir em cerca de 30% a atividade de FASN, conforme verificado pela redução da lipogênese com uso de acetato marcado com ^{14}C (Kridel *et al.*, 2004; Browne *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). Tal redução não foi dose-dependente como observamos em outros resultados (proliferação e apoptose, por exemplo), mas temos que considerar que os tempos de tratamento desses experimentos diferem do tempo utilizado na medida da lipogênese. Previamente verificamos que o tratamento das mesmas células de melanoma com cerulenina ou orlistat resultou em 60 e 50% de inibição da atividade enzimática de FASN, respectivamente (Zecchin *et al.* 2010), embora nesse caso, o marcador utilizado para a lipogênese tenha sido a água triciada ($^3\text{H}_2\text{O}$).

Realizamos experimentos de silenciamento de FASN a fim de confirmar que a proliferação de células de melanoma é de fato dependente de FASN e que as alterações verificadas nas proteínas do ciclo celular descritas anteriormente ocorrem em consequência de sua inibição enzimática. RNAi reduziu em 80% o conteúdo de FASN e em 30% a proliferação celular. Diante do perfil de alterações protéicas por nós verificadas, o silenciamento de FASN promoveu acúmulo de p21^{WAF1/Cip1}, com tendência a aumento de p27^{kip1}, assim como redução significativa de Skp2 e cdk2, confirmando nossos achados *in vitro* e *in vivo* de que a proliferação de células de melanoma é dependente de FASN.

Por último, avaliamos os efeitos do tratamento com C75 através de medidas de tumores subcutâneos. De fato, C75 também se mostrou como potencial agente anti-tumoral uma vez que os animais tratados desenvolveram tumores significativamente menores do que os tumores dos animais controle, sem que houvesse um quadro de

anorexia e perda de peso como é relatado na literatura (Pizer *et al.* 2000; Relat *et al.*, 2012).

Em trabalho prévio, com células de melanoma humano A-375, C75 mostrou menor eficácia do que a cerulenina no que diz respeito à inibição da proliferação celular e indução de inviabilidade (Ho *et al.*, 2007). Desse modo, em nossa proposta inicial, tínhamos em mente comparar a eficácia de C75 com a cerulenina no que diz respeito aos parâmetros aqui estudados. Apesar da cerulenina parecer mais “eficaz” já que precisa de um menor tempo de incubação do que C75 para se obter os mesmos resultados, este não se trata de um estudo farmacológico puro. A inibição de FASN foi maior quando as células B16-F10 foram tratadas com cerulenina, mas o método utilizado para a medida da lipogênese foi diferente. Mesmo sendo C75 o análogo sintético da cerulenina e agir sobre o mesmo sítio catalítico de FASN (Pizer *et al.*, 1998; Kuhajda *et al.*, 2000), certamente existem algumas diferenças entre estes agentes. Um exemplo foi o discreto aumento de células em G2/M do ciclo celular após tratamento com C75, fato não verificado quando a cerulenina utilizada foi utilizada para inibir FASN (Ortega, 2010).

Correlacionando os dados apresentados, podemos sugerir que, em nosso modelo experimental, a inibição de FASN resulta em inibição da proliferação das células de melanoma B16-F10 através do seguinte mecanismo: o aumento de p21^{WAF1/Cip1} e p27^{Kip1}, duas proteínas que funcionam como inibidoras de quinases dependentes de ciclinas (ckis) podem ser o responsáveis pela inibição do complexo ciclina E/cdk2, impedindo que haja fosforilação e ativação de Rb. Esta hipótese é reforçada pela não alteração do conteúdo de ciclina E, além da redução de cdk2. Paralelamente, a redução de Skp2 sugere ausência de ubiquitinação e degradação de p27^{Kip1}, o que permite a esta proteína atuar como um co-fator negativo do ciclo celular.

Concluindo, nas células de melanoma B16-F10, a inibição de FASN primeiramente altera os níveis das proteínas p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, Skp2, ciclinas D1 e E, e cdk2 envolvidas na transição de G1 para S, reduzindo a proliferação das células neoplásicas, seguido da ativação de morte celular por apoptose com envolvimento mitocondrial ([Zecchin et al., 2011](#))., culminando, por fim, em redução do volume tumoral.

7 CONCLUSÃO

- ✓ Proliferação e sobrevivência de células de melanoma B16-F10 são dependentes de FASN, uma vez que há redução das taxas de proliferação celular e indução de apoptose após inibição farmacológica de FASN ou através de seu silenciamento com siRNA.
- ✓ A inibição de FASN com C75 aumenta os conteúdos das proteínas p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, assim como reduz Skp2 e cdk2, envolvidas na transição da fase G1 para S do ciclo celular.
- ✓ A inibição farmacológica de FASN não altera os níveis de ciclina E, cdk4 e 6 em células de melanoma B16-F10.
- ✓ Os efeitos anti-proliferativos de C75 em células B16-F10 foram confirmados pelo silenciamento de FASN com RNAi.
- ✓ C75 apresenta efeito anti-tumoral decorrente não apenas da inibição da proliferação e indução de apoptose das células tumorais, *in vivo*, mas também da inibição do crescimento de melanomas em dorso de camundongos.
- ✓ A inibição de FASN primeiramente altera os níveis de proteínas envolvidas na transição de G1 para S e posteriormente induz apoptose em células de melanoma B16-F10.

REFERÊNCIAS*

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Abbas T, Dutta A. p21 in câncer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(6): 400-14.

Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, et al. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol*. 2004; 40: 728-35.

Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L, et al. Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol*. 2005; 76(2): 272-8.

Alo PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, et al. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep*. 2000; 7(6): 1383-8.

Andrade BA, Toral-Rizo VH, León JE, Contreras E, Carlos R, Delgado-Azañero W, et al. Primary oral melanoma: a histopathological and immunohistochemical study of 22 cases of Latin America. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012; 17(3): e383-8.

Andrade BA, León JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, Paes-de-Almeida O. Immunohistochemical expression of Skp2 protein in oral nevi and melanoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013 May 1; 18(3): e388-91

Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SK, Hirota S, Hosobe S et al. Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006; 66(11): 5934-40

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização *International Committee of Medical Journal Editors*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com *Medline*.

Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem.* 2004; 91(1): 47-53.

Barton MC, Akli S, Keyomarsi K. Deregulation of Cyclin E Meets Dysfunction in p53: Closing the Escape Hatch on Breast Cancer *J Cell Physiol.* 2006; 209(3): 686-94.

Bastos DC. Efeitos da inibição da atividade de FASN sobre a linfangiogênese em modelo murino [Dissertação]. Piracicaba:UNICAMP/FOP; 2009.

Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Cdk2 Knockout Mice Are Viable. *Curr Biol.* 2003; 13(20): 1775-85.

Bligh EG e Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8): 911-7.

Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem.* 2003; 278(28): 25752-7.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 7(72): 248-54.

Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. 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.* 1993; 268(19): 14490-6.

Brink J, Ludtke SJ, Yang CY, Gu ZW, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(1): 138-43.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997 2; 89(3): 331-40.

Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(20): 11041-8.

Browne CD, Hindmarsh EJ, Smith JW. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J.* 2006; 20(12):2027-35.

Bucher N, Britten CD. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer*. 2008; 98(3): 523-8.

Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(9): 671-82.

Carnero A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2002; 87(2): 129-33.

Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, 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*. 2008; 123(11): 2557-65.

Chalbos D, Chambon M, Ailhaud G, Rochefort H. Fatty acid synthetase and its mRNA are induced by progestins in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1987; 262(21): 9923-6.

Chiariello M, Esposito G. Skp2 Modulates Cyclic Nucleotides Antiproliferative Effects. *Circ Res*. 2006; 98(9): 1113-4.

Chirala SS, Jayakumar A, Gu ZW, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(6): 3104-8.

Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, 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*. 2003; 100(11): 6358-63.

Coletta RD, Christensen K, Reichenberg KJ, Lamb J, Micomonaco D, Huang L, et al. The Six1 homeoprotein stimulates tumorigenesis by reactivation of cyclin A1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(17): 6478-6483.

Cooper GM e Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach*, 5ª ed., março, 2009.

de Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*. 1993; 363(6430): 595-602.

Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4, and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet Cell Genet*. 1995; 66(1): 72-4.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001; 412(6849): 822-6.

Dowling S, Cox J, Cenedella RJ. 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*. 2009; 44(6): 489-98.

Ellis M, Chew YP, Fallis L, Freddersdorf S, Boshoff C, Weiss RA, et al. Degradation of p27Kip inhibitor triggered by Kaposi's sarcoma virus cyclin-cdk6 complex. *EMBO J*. 1999; 18(3): 644-53.

Epstein JI, Carmichael M, Partin AW. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. *Urology*. 1995; 45(1): 81-6.

Fecher LA, Amaravadi RK, Schuchter LM, Flaherty KT. Drug targeting of oncogenic pathways in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009; 23(3): 599-618.

Femiano F, Lanza A, Buonaiuto C, Gombos F, Di Spirito F, Cirillo N. Oral malignant melanoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2008 Aug; 37(7): 383-8.

Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*. 2010 Apr; 6(4): 551-62.

Fukasawa K. p53, Cyclin-dependent Kinase and Abnormal Amplification of Centrosomes. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1786(1): 15-23.

Fukuda H, Noguchi T, Iritani N. Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene and ATP citrate-lyase gene by Sp1 and Sp3 in rat hepatocytes(1). *FEBS Lett*. 1999; 464(3): 113-7.

Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res*. 1997; 17(6D): 4589-93.

Gansler TS, Hardman W 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol*. 1997; 28(6): 686-92.

Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2004; 5(3): 253-61.

Grossel MJ, Baker GL, Hinds PW. cdk6 can shorten G(1) phase dependent upon the N-terminal INK4 interaction domain. *J Biol Chem*. 1999; 274(42): 29960-7.

Grossel MJ, Hinds PW. From Cell Cycle to Differentiation. An Expanding Role for cdk6. *Cell Cycle*. 2006; 5(3): 266-270.

Guan XB, Sun Z, Chen XX, Wu HR, Zhang XY. Inhibitory effects of Zengshengping fractions on DMBA-induced buccal pouch carcinogenesis in hamsters. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Jan; 125(2): 332-7.

Guerciolini R. Mode of action of orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997; 21(3): S12-23.

Halaban R. Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer Metastasis Rev*. 1999; 18(3): 333-43.

Harwell RM, Mull BB, Porter DC, Keyomarsi K. Activation of cyclin-dependent kinase 2 by full length and low molecular weight forms of cyclin E in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2004 Mar 26; 279(13): 12695-705.

Hashemi Pour MS. Malignant melanoma of the oral cavity: a review of literature. *Indian J Dent Res*. 2008 Jan-Mar; 19(1): 47-51.

Heemers H, Maes B, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. 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*. 2001; 15(10): 1817-28.

Hershko DD. Oncogenic Properties and Prognostic Implications of the Ubiquitin Ligase Skp2 in Cancer. *Cancer*. 2008; 112(7): 1415-24.

Ho TS, Ho YP, Wong WY, Chi-Ming Chiu L, Wong YS, Eng-Choon Ooi V. Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother*. 2007; 61(9): 578-87.

Hochegger H, Takeda S, Hunt T. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? 2008; 9(11): 910-6.

Horiguchi A, Asano T, Asano T, Ito K, Sumitomo M, Hayakawa M. Fatty acid synthase over expression is an indicator of tumor aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2008; 180(3): 1137-40.

Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans*. 2002; 30(Pt 6): 1091-5.

Ibrahim N, Haluska FG. Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4: 551-79.

INCA – Instituto Nacional de Câncer: Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2013, disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2006> [acessado em 01 de dezembro de 2013].

Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiane V, Silipo V, La Torre G *et al*. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2003; 30(1): 23-8.

Jackowski S, Wang J, Baburina I. Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1483(3): 301-15.

Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, et al. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(19): 8695-9.

Joyce NC, Harris DL. Decreasing expression of the G1-phase inhibitors, p21Cip1 and p16INK4a, promotes division of corneal endothelial cells from older donors. *Mol Vis*. 2010; 16: 897-906.

Kant S, Kumar A, Singh SM. Fatty acid synthase inhibitor orlistat induces apoptosis in T cell lymphoma: role of cell survival regulatory molecules. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Nov; 1820(11): 1764-73.

Kapur P, Rakheja D, Roy LC, Hoang MP. Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. *Mod Pathol*. 2005; 18(8): 1107-12.

Kearney KE, Pretlow TG, Pretlow TP. Increased expression of fatty acid synthase in human aberrant crypt foci: possible target for colorectal cancer prevention. *Int J Cancer*. 2009; 125(1): 249-52.

Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2001; 2(4): 282-6.

Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem.* 2004; 279(29): 30540-5.

Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res.* 2004; 64(6): 2070-5.

Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE et al. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck.* 1999; 21(4): 325-9.

Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, et al. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul 5;91(14):6379-83.

Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(7): 3450-4.

Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res.* 2003; 63(1): 132-9.

Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology.* 2002; 40(1): 71-9.

Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I 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.* 2001; 276(15): 11512-6.

Levin MS, Talkad VD, Gordon JI, Stenson WF. Trafficking of exogenous fatty acids within Caco-2 cells. *J Lipid Res.* 1992; 33(1): 9-19.

Li JN, Gorospe M, Chrest FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WF, et al. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res.* 2001; 61(4): 1493-9.

Li Q, Murphy M, Ross J, Sheehan C, Carlson JA. Skp2 and p27kip1 expression in melanocytic nevi and melanoma: an inverse relationship. *J Cutan Pathol.* 2004 Nov; 31(10): 633-42.

Li W, Sanki RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, McCarthy SW, et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology.* 2006; 38(4): 287-301.

Lin J, Hocker TL, Singh M, Tsao H. Genetics of melanoma predisposition. *Br J Dermatol.* 2008; 159(2): 286-91.

Little JL, Wheeler FB, Fels DR, Koumenis C, Kridel SJ. Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1262-9.

Liu B, Wang Y, Fillgrove KL, Anderson VE. 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.* 2002; 49(3): 187-93.

Liu H, Liu JY, Wu X, Zhang JT. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *Int J Biochem Mol Biol.* 2010 Jul 18; 1(1): 69-89.

Liu X, Shi Y, Giranda VL, Luo Y. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA-MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(3): 494-501.

Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med.* 1997; 3(2): 231-4.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science.* 2000; 288(5475): 2379-81.

Lupo R, Menendez JA. Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators? *Endocrinology*. 2006; 147(9): 4056-66.

Macleod KF. The Role of the RB tumour suppressor pathway in oxidative stress responses in the haematopoietic system. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(10): 769-81.

Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(3): 222-31.

Malumbres M, Barbacid. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 2005; 30(11): 630-41.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(3): 153-66.

Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G *et al*. Cyclin-dependent kinases: a family portrait *Nat Cell Biol*. 2009; 11(11): 1275-6.

Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 Degradation Is Sufficient to Induce G1 Cell Cycle Arrest despite Constitutive Expression of Cyclin E2 in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res*. 2009; 69(16): 6565-72.

Matsuda Y, Ichida T p16 and p27 are functionally correlated during the progress of hepatocarcinogenesis *Med Mol Morphol*. 2006; 39(4): 169-75.

Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res*. 1953; 13(1): 27-9.

Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, et al. Inhibition of fatty acid synthase (FAZ) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(29): 10715-20.

Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Orlistat: from antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB-2)-overexpressing gastrointestinal tumors? *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005a; 230(3): 151-4.

Menendez JA, Vellon L, Lupu R. 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.* 2005b; 16(8): 1253-67.

Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(10): 763-77.

Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C *et al.* A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* 1992; 11(8): 2909-17.

Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G, *et al.* Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Apr 1; 101(7): 519-32.

Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997; 3 (11): 2115-20.

Mitra D, Fisher DE. Transcriptional regulation in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009; 23(3): 447-65.

Moroy T, Geisen C. Cyclin E. *Int J Bioch Cell Biolog.* 2004; 36(8): 1424-39.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.

Murata S, Yanagisawa K, Fukunaga K, Oda T, Kobayashi A, Sasaki R, *et al.* Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci.* 2010; 101(8): 1861-5.

Naliwaiko K, Luvizon AC, Donatti L, Chammas R, Mercadante AF, Zanata SM, *et al.* Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway. *Chem Biol Interact.* 2008; 173(2): 122-8.

Neganova I, Lako M. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *J Anat.* 2008; 213(1): 30-44.

Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzuki T, et al. Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology*. 2001; 69(6): 297-303.

Nurse P. Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Eur J Cancer*. 1997; 33(7): 1002-4.

Ogino S, Shima K, Baba Y, Nosho K, Irahara N, Kure S, et al. Colorectal Cancer Expression of PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma) is Associated With Good Prognosis. *Gastroenterology*. 2008 Dec 24.

Ogino S, Shima K, Nosho K, Irahara N, Baba Y, Wolpin BM, et al. A cohort study of p27 localization in colon cancer, body mass index, and patient survival *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(6): 1849-58.

Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(5): 2612-24.

Okawa Y, Hideshima T, Ikeda H, Raje N, Vallet S, Kiziltepe T, et al. Fatty acid synthase is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2008; 141: 659–671

Omura S. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol Rev*. 1976; 40(3): 681-97.

Orita H, Coulter J, Lemmon C, Tully E, Vadlamudi A, Medghalchi SM, et al. Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(23): 7139-45.

Orita H, Coulter J, Tully E, Kuhajda FP, Gabrielson E. Inhibiting fatty acid synthase for chemoprevention of chemically induced lung tumors. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(8): 2458-64.

Ortega RM. Regulação do ciclo celular após inibição farmacológica da enzima ácido graxo sintase em linhagem derivada de melanoma murino B16-F10 [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010.

Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC, 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.* 2000; 31(9): 1068-73.

Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1996a; 56(12): 2745-7.

Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res.* 1996b; 56(6): 1189-93.

Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res.* 1998; 58(20): 4611-5.

Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, 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.* 2000; 60(2): 213-8.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 1994; 8(1): 9-22.

Ragan VS, Joshi AK, Smith S. Mapping the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation in vitro. *Biochemistry.* 2001; 40(36): 10792-9.

Relat J, Blancafort A, Oliveras G, Cufí S, Haro D, Marrero PF, et al. Different fatty acid metabolism effects of (±)-Epigallocatechin-3-Gallate and C75 in Adenocarcinoma lung cancer. *BMC Cancer.* 2012 Jul 6; 12(1): 280.

Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, et al. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003; 3(5): 573-85.

Rossato FA. Avaliação da morte celular induzida por inibidores da enzima ácido graxo sintase em linhagem celular derivada de melanoblastos não tumorigênicos de camundongos [Dissertação]. Campinas: UNICAMP/FCM; 2010.

Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T, et al. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res.* 2003; 1(10): 707-15.

Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Dei Tos AP, Fletcher JÁ, et al. Gastrointestinal stromal tumours overexpress fatty acid synthase. *J Pathol.* 2006; 209(3): 369-75.

Schrump DS, Chen GA, Consuli U, Jin X, Roth JA. Inhibition of esophageal cancer proliferation by adenovirally mediated delivery of p16INK4. *Cancer Gene Ther.* 1996; 3(6): 357-64.

Seguin F, Carvalho MA, Bastos DC, Agostini M, Zecchin KG, Alvarez-Flores MP, et al. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. *Br J Cancer.* 2012 Sep 4; 107(6):977-87. doi: 10.1038/bjc.2012.355. Epub 2012 Aug 14.

Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, et al. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol.* 2004; 40(7): 688-96.

Shah US, Dhir R, Gollin SM, Chandran UR, Lewis D, Acquafondata M, et al. Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2006; 37(4): 401-9.

Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(24): 13656-61.

Smith S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* 1994; 8(15): 1248-59.

Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res.* 2003; 42(4): 289-317.

Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A, et al. Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ.* 1996; 7(2): 135-46.

Stoops JK, Wakil SJ. Animal fatty acid synthetase. A novel arrangement of the beta-ketoacyl synthase sites comprising domains of the two subunits. *J Biol Chem.* 1981; 256(10): 5128-33.

Sutherland RL, Musgrove EA. CDK inhibitors as potential breast cancer therapeutics: new evidence for enhanced efficacy in ER+ disease. *Breast Cancer Res.* 2009; 11(6): 112.

Swinnen JV, Ulixir W, Heyns W, Verhoeven G. Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(24):12975-80.

Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res.* 1997; 57(6): 1086-90b.

Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway *Oncogene.* 2000; 19(45): 5173-81.

Swinnen JV, Heemers H, Heyns W, Verhoeven G. Androgen regulation of lipogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2002; 506(Pt A): 379-87.

Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(6): 2204-12.

Tsuji T, Yoshinaga M, Togami S, Douchi T, Nagata Y. Fatty acid synthase expression and clinicopathological findings in endometrial cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004; 83(6): 586-90.

Tsukamoto, Y., H. Wong. The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. *J Biol Chem,* 1983; 258(24): 15312-22.

Uddin S, Hussain AR, Ahmed M, Abubaker J, Al-Sanea N, Abduljabbar A, et al. High prevalence of fatty acid synthase expression in colorectal cancers in Middle Eastern patients and its potential role as a therapeutic target. *Am J Gastroenterol.* 2009; 104(7): 1790-801.

van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verthoeven G, Swinnem JV. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002; 62(3): 642-6.

van de Sande T, Roskams T, Lerut E, Joniau S, Van Poppel H, Verhoeven G, et al. High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. *J Pathol.* 2005; 206(2): 214-9.

van Riggelen J, Felsher DW. Myc and a Cdk2 senescence switch. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(1): 7-9.

Veiga SS, Elias MCQB, Gremski W, Porcionatto MA, da Silva R, Nader HB, et al. Post-translational modifications of alpha5beta1 integrin by glycosaminoglycan chains. The alpha5beta1 integrin is a facultative proteoglycan *J Biol Chem.* 1997 May 9; 272(19): 12529-35.

Vlad DH, Ighes-Mullol J, Maher JV. Velocity-jump instabilities in Hele-Shaw flow of associating polymer solutions. *Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 1999; 60(4 Pt B): 4423-30.

Visca P, Alò PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F, 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.* 1999; 5(12): 4111-8.

Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, Filippi S, et al. Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res.* 2003; 23(1A): 335-9.

Vodermaier HC. APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol.* 2004; 14(18): R787-96.

Wadler S. Perspectives for cancer therapies with cdk2 inhibitors. *Drug Resist Updat.* 2001 Dec; 4(6): 347-67.

Wakil SJ. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry.* 1989; 28(11): 4523-30.

Waltregny D, Leav I, Signoretti S, Soung P, Lin D, Merk F, et al. Androgen-driven prostate epithelial cell proliferation and differentiation in vivo involve the regulation of p27. *Mol Endocrinol*. 2001; 15(5): 765-82.

Wang X, Tian W. Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 288(5): 1200-6.

Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization *J Biol Chem*. 1993; 268(19): 14497-504.

Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Korber E, 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*. 1986; 367(9): 905-12.

Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*. 2001; 61(S2): 1-13.

Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, Melo DR, Alberici LC, Oliveira HCF, et al. Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. *Lab Invest*, 2011;91(2):232-40.

Zecchin KG, Alberici LC, Riccio MF, Eberlin MN, Vercesi AE, Graner E, et al. Visualizing Inhibition of Fatty Acid Synthase through Mass Spectrometric Analysis of Mitochondria from Melanoma Tumor Cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011;25(3):449-52.

Zhang Y, Guo C, Yu G. A pilot study of fatty acid metabolism in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34(1): 78-81.

Zhao W, Kridel S, Thorburn A, Kooshki M, Little J, Hebbar S, et al. Fatty acid synthase: a novel target for anti-glioma therapy. *Br J Cancer*. 2006; 95, 869–78.

Zhou W, Han WF, Landree LE, Thupari JN, Pinn ML, Bililign T, et al. Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2007; 67(7): 2964-71.

ANEXO I



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

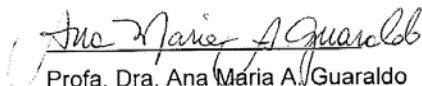
CERTIFICADO

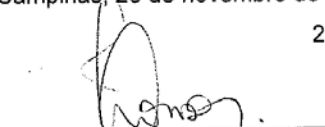
Certificamos que o projeto "Conseqüências *in vivo* da inibição farmacológica da enzima ácido graxo sintase sobre proteínas do ciclo celular em melanoma murino derivado da linhagem B16-F10" (protocolo nº 2321-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Karina Gottardello Zecchin / Rose Mara Ortega, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 21 de fevereiro de 2011.

Campinas, 28 de novembro de 2013.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva