



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



FABIANA SEGUIN
Cirurgiã-dentista

***ESTUDO DO PAPEL BIOLÓGICO DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO
SINTASE (FASN) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DERIVADAS
DOS VASOS SANGUÍNEOS***

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

Orientador: Edgard Graner

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Fabiana Seguin, e orientada pelo Prof. Dr. Edgard Graner

Assinatura do Orientador

**PIRACICABA
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
GARDÊNIA BENOSSI – CRB8/8644 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Se39e Seguin, Fabiana, 1984-
Estudo do papel biológico da enzima ácido graxo sintase
(FASN) em células endoteliais derivadas dos vasos sanguíneos /
Fabiana Seguin. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Edgard Graner.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Melanoma. I. Graner, Edgard. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Study of the biological role of the enzyme fatty acid synthase
(FASN) in endothelial cells derived from blood vessels

Palavras-chave em Inglês:

Melanoma

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Edgard Graner [Orientador]

Vanessa Moraes Freitas

Alan Roger dos Santos Silva

Ana Paula de Souza Pardo

Lays Martin Sobral

Data da defesa: 15-12-2011

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 15 de Dezembro de 2011, considerou a candidata FABIANA SEGUIN aprovada.

Prof. Dr. EDGARD GRANER

Profa. Dra. VANESSA MORAIS FREITAS

Prof. Dr. ALAN ROGER DOS SANTOS SILVA

Profa. Dra. ANA PAULA DE SOUZA PARDO

Profa. Dra. LAYS MARTIN SOBRAL

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Maria Luísa** e **Antônio Carlos**, pelo amor, pelo cuidado em minha educação e pelo exemplo de humildade.*

*Aos meus queridos avós, **Luís** e **Ottília** “In memorian”, **Encarniación** “In memorian” e **Venâncio**, pelo carinho e pela sabedoria.*

*Ao meu irmão, **Felipe**, pela amizade e pela cumplicidade.*

*Ao meu marido, **Greison** e à minha filha **Luísa** que preenchem minha vida de otimismo e alegria.*

“Deus nos dá pessoas e coisas, para aprendermos a alegria...
Depois, retoma coisas e pessoas para ver se já somos capazes da alegria
sozinhos...
Essa... a alegria que ele quer”

João Guimarães Rosa

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Edgard Graner**, agradeço todo o incentivo, dedicação e a maneira com que simplificou os desafios no decorrer do nosso trabalho. Registro todo meu carinho e respeito.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi construído e 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. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos Profs. Drs. **Alan Roger dos Santos Silva, Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Augustin Vargas, Ricardo Della Coletta**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo exemplo de mestres, que dedicam seu tempo com competência e seriedade a educação e a pesquisa, registro todo meu respeito e admiração.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado, no período de agosto de 2009 à julho de 2010;

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de doutorado, no período de agosto de 2010 à dezembro de 2011;

À Prof^a Dr^a. **Michelle Agostini** pela amizade, paciência e humildade com que me ensinou desde minha iniciação científica as técnicas laboratoriais.

À Prof^a Dr^a. **Ana Lúcia Rangel** pelo apoio e pela agradável amizade.

À Prof^a Dr^a. **Karina Gottardelo Zecchin** pela amizade e pelas sempre valiosas sugestões.

Às Prof^{as} Dr^{as}. **Ana Marisa Chudzinski-Tavassi** e **Miryam Paola Alvarez Flores** pela contribuição e disponibilidade com que auxiliaram para o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos da pós-graduação, **Alícia, Felipe, Marcondes, Sabrina, Ana Lúcia, Bruno, Daniel, Fernanda Basso, Fernanda Mariano, Katya, Lara, Marianne, Mario, Marisol, Patrícia, Renato, Rogério, Sabino, Sibelle, Tânia, Victor e Wilfredo** pela troca de conhecimentos e agradáveis momentos de estudo.

Às amigas do laboratório **Lays, Andréia Bufalino, Andréia Silva, Manoela, Rose, Luciana, Ana Camila, Camilla, Elizabete, Isadora e Priscila** pelo auxílio, pela troca de experiências e pelo agradável ambiente de trabalho.

Ao amigo **Marco Antônio**, por compartilhar o trabalho e pela agradável convivência.

À amiga **Débora**, pela generosa contribuição e principalmente pela amizade consolidada.

Aos funcionários do laboratório de Patologia, **Sr. João Carlos, Luana, Fabiana, Valéria** e aos funcionários do Orocentro **Sra. Aparecida e Rogério**, pela colaboração e generosidade.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

João Guimarães Rosa

A enzima ácido graxo sintase (FASN), cuja expressão e atividade estão elevadas em várias neoplasias malignas humanas, é responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa e, conseqüentemente, pela produção de fosfolipídios das membranas celulares. A inibição de FASN com orlistat (Xenical), uma droga anti-obesidade, é descrita como tendo propriedades anti-neoplásicas nos cânceres de próstata, mama, bem como no melanoma. Este composto parece desempenhar também um papel anti-angiogênico, uma vez que foi descrito como inibidor da proliferação de células endoteliais e da neovascularização em ensaio *ex vivo*. Em trabalho recente, realizado por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que o tratamento de camundongos portadores de melanomas intraperitoneais com orlistat reduziu em cerca de 50% o número de metástases para linfonodos mediastínicos. Em outro estudo, também realizado por nosso grupo, foi observado que a inibição da atividade de FASN pode ter um papel sobre a angiogênese induzida por melanomas experimentais, pois a densidade de vasos sanguíneos ao redor destes tumores foi significativamente reduzida pelo tratamento com orlistat. Considerando as evidências sugerindo um papel biológico relevante de FASN na disseminação metastática de melanomas, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivo principal investigar as conseqüências da inibição da atividade de FASN em cultura de células endoteliais de vasos sanguíneos, através da análise do ciclo celular e das taxas de apoptose. A expressão dos diversos fatores da família VEGF foi avaliada por RT-PCR quantitativo em células de melanoma e carcinoma espinocelular bucal. Os resultados obtidos mostram que orlistat e cerulenina inibem a viabilidade, induzem a apoptose e reduzem *in vitro* a formação de vasos sanguíneos pelas células endoteliais RAEC. No entanto, o mesmo tratamento não reduz a viabilidade e nem reduzem a formação de vasos sanguíneos *in vitro* pelas células endoteliais HUVEC. A inibição de FASN nas células neoplásicas SK-MEL-25 e SCC-9 aumenta a expressão de RNAs mensageiros para VEGFA e que o meio

condicionado por estas células com orlistat reduz a formação *in vitro* de vasos sanguíneos e a proliferação das células HUVEC. Nossos resultados sugerem que FASN parece ser importante para a sobrevivência das células RAEC e que a inibição de FASN modula a expressão das isoformas de VEGFA.

Palavras-chave: melanoma / carcinoma espinocelular bucal/ ácido graxo sintase / orlistat / angiogênese

ABSTRACT

Fatty acid synthase (FASN) is the anabolic enzyme with high expression and activity in several human malignancies, which is responsible for the endogenous synthesis of saturated fatty acids and consequently of the phospholipids present in cell membranes. Inhibition of FASN with orlistat (Xenical), an anti-obesity drug, is described as having anti-neoplastic properties in breast and prostate cancers as well as in melanoma. An anti-angiogenic role, has been attributed to this drug, since it inhibits the proliferation of endothelial cells and the neovascularization in ex vivo both assays. In recent studies performed by our group, it was demonstrated that the treatment of mice bearing intraperitoneal melanoma with orlistat reduced by 50% the number of metastases to mediastinal lymph nodes. In another study, also conducted by our group, we observed that the inhibition of FASN reduces the angiogenesis induced by experimental melanomas, since the density of blood vessels around tumors was significantly decreased by the treatment with orlistat. In the present work investigated the consequences of the treatment with FASN inhibitors the proliferation and apoptosis cultured endothelial cells. The expression of the VEGF family of growth factors were assessed by quantitative RT-PCR in both melanoma and squamous cell carcinoma cells. The results show that orlistat and cerulenin inhibit the viability and induce apoptosis and reduce the formation of blood vessels by RAEC cells in vitro. However, the same treatment does not reduce the viability and not reduce the formation of blood vessels by HUVEC cells in vitro. The inhibition of FASN in neoplastic cells SK-MEL-25 and SCC-9 increases the expression of mRNAs for VEGF and the conditioned medium by these cells with orlistat reduces the formation of blood vessels in vitro and proliferation of HUVEC cells. Together, the experiments show that FASN seems to be important for the survival of RAEC cells and FASN inhibition modulates the expression of VEGF isoforms.

Key words: melanoma/ oral squamous cell carcinoma / fatty acid synthase / orlistat
/ angiogenesis

LISTA DE ABREVIATURAS

DAPK2: *death-associated protein kinase 2*

cDNA: DNA complementar

DTT: Ditionietol

DMSO: Di-metil sulfóxido

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*- Ácido etileno diamino tetracético

EGF: **Epidermal Growth Factor**- Fator de crescimento epidérmico

ErbB receptor: *Epidermal Growth Factor Receptor*- Receptor de fator de crescimento epidérmico

FASN: *Fatty acid synthase* - Ácido graxo sintase

FBS: *Fetal Bovine Serum* - Soro fetal bovino

FGF: *Fibroblast growth factor* - Fator de crescimento para fibroblastos

HE: Hematoxilina e eosina

HIF-1: *Hypoxia-Inducible Factor* - Fator indutor de hipóxia-1

IL: Interleucina

kDa: *Kilodalton*- Quilodaltons

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* - Proteína-quinase ativada por mitógeno

MMP: Metaloproteinases da matriz

mRNA: RNA mensageiro

NRP-1: Neuropilina 1

NRP-2: Neuropilina 2

PA: **Plasminogen Activator** - Ativador de plasminogênio

pb: Pares de bases

PBS: *Phosphate Buffered Saline* - Solução salina tamponada com fosfato

PCR: *Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia de polimerase

PDGF: **Platelet-derived growth factor** - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PI-3K: *Phosphatidylinositol -3- kinase* - Fosfoinositídeo-3-quinase

PIGF: *Placental Growth Factor* - Fator de crescimento placentário

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride* - Fenilmetilsulfonil fluoreto
RNAi: RNA de interferência
RT-PCR: *Reverse transcriptase-PCR*
SDS: *Sodium Dodecyl Sulphate* - Dodecil Sulfato de Sódio
SREBP: *Sterol regulatory element binding proteins*- Proteínas ligantes da região regulada por proteínas
STI: *Soybean Trypsin Inhibitor* - Inibidor de tripsina
TNF: **Tumor necrosis factor**- Fator de necrose tumoral
TRAIL: *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*
UV: Ultravioleta
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*- Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR: *Vascular endothelial growth factor receptor*- Receptor de Fator de crescimento endotelial vascular
VHL: Von Hippel Lindau
xg: Força centrífuga

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Ácido graxo sintase (FASN)	4
2.2. Regulação de FASN	6
2.3. Inibidores de FASN	8
2.4. Efeitos biológicos da inibição de FASN	11
2.5. Angiogênese tumoral	13
2.6. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	15
2.7. Isoformas de VEGFA	16
2.8. VEGFA em neoplasias malignas	18
2.9. Atividade de VEGFA e FASN	19
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Cultura de células	22
4.2. Preparo das soluções de orlistat e cerulenina	23
4.3. Silenciamento de FASN através de siRNA	23
4.4. Análise da viabilidade celular	24
4.5. Avaliação das taxas de morte por apoptose e ciclo celular	25
4.6. Análise da proliferação das células RAEC cultivadas em meio condicionado pelas células B16-F10	26
4.7. Análise da proliferação das células HUVEC cultivadas em meio condicionado pelas células SK-MEL-25 ou SCC-9	26
4.8. Análise da proliferação das células RAEC e HUVEC cultivadas em meio condicionado pelas células B16-F10, SK-MEL-25 ou SCC-9 tratadas com orlistat	27
4.9. Ensaio <i>in vitro</i> de formação de estruturas vasculares	27
4.10. Ensaio ELISA	28

4.11. Análise do efeito do tratamento com orlistat sobre a expressão de VEGFR-2	28
4.12. Análise dos efeitos de orlistat sobre a expressão das isoformas de VEGFA	29
4.13. Forma de análise dos resultados	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Efeitos do tratamento com orlistat ou cerulenina sobre as células RAEC e HUVEC	32
5.1.1. Orlistat ou cerulenina provocam perda de viabilidade e induzem apoptose em células RAEC	32
5.1.2. Efeitos do orlistat e da cerulenina na formação de túbulos endoteliais pelas células RAEC	35
5.1.3. Orlistat ou cerulenina não alteram a viabilidade das células endoteliais HUVEC	37
5.1.4. Efeitos do orlistat e da cerulenina na formação de túbulos endoteliais pelas células HUVEC	38
5.2. O meio de cultura condicionado por células neoplásicas aumenta a proliferação das células endoteliais derivadas de vasos sanguíneos	39
5.3. Efeitos dos meios de cultura condicionados por células neoplásicas tratadas com orlistat sobre a proliferação das células endoteliais derivadas dos vasos sanguíneos	45
5.4. Efeitos dos meios de cultura condicionados por células neoplásicas tratadas com orlistat sobre a formação de estruturas semelhantes a vasos pelas células HUVEC	47
5.5. Efeitos da cerulenina e do orlistat sobre a expressão de RNAs mensageiros de VEGFA	49
5.6. Orlistat aumenta a expressão do receptor VEGFR-2 nas células endoteliais RAEC	57
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES	66

1.INTRODUÇÃO

A enzima lipogênica FASN é produzida em grandes quantidades em diversos tumores malignos humanos e apontada como um oncogene metabólico, em virtude de sua habilidade em favorecer a sobrevivência de células tumorais. A expressão aumentada de FASN pode ser detectada em fases precoces da tumorigênese e está associada com formas agressivas da doença, estando também ligada a um pior prognóstico para alguns tipos de tumores. A inibição de FASN em células malignas causa redução do ciclo celular e morte por apoptose, o que faz com que esta enzima seja apontada como um alvo promissor para o tratamento do câncer. Angiogênese é o termo usado para descrever o mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes. Em suma o crescimento de vasos sanguíneos pode acontecer por via de dois mecanismos diferentes: *vasculogênese* e *angiogênese*. *Vasculogênese* indica o desenvolvimento de novos vasos durante a fase embrionária (Carmeliet *et al.*, 2001). A formação de vasos sanguíneos é um achado proeminente nas neoplasias malignas, sendo importante na progressão e desenvolvimento de metástases.

Resultados prévios obtidos em nossa dissertação de mestrado indicam que a angiogênese induzida pelo implante intradérmico de células B16-F10 foi significativamente reduzida pela inibição da FASN com orlistat. O trabalho de Carvalho *et al.* (2008), também realizado em nosso laboratório, mostrou que camundongos C57BL6 tratados com orlistat têm diminuição da síntese endógena de lipídios e, mais importante, apresentam redução de até 50% no número de metástases espontâneas para linfonodos mediastínicos em melanomas experimentais. A inibição de FASN com orlistat ou cerulenina, em células de melanoma murino B16-F10, inibe a proliferação e induz morte por apoptose com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3 (Zecchin *et al.*, 2010). FASN interfere também no processo de linfangiogênese induzida por melanomas experimentais, pois a densidade de vasos linfáticos ao redor destes tumores foi significativamente aumentada pelo tratamento com orlistat (dados ainda não

publicados). Finalmente, em outro estudo realizado em nosso laboratório, foi observado em modelo ortotópico de carcinoma espinocelular bucal que o tratamento com orlistat reduz significativamente o número de metástases para linfonodos cervicais regionais, além de diminuir substancialmente o tamanho dos tumores primários localizados na língua (dados ainda não publicados).

Browne *et al.* (2006) relataram as primeiras evidências experimentais de que orlistat suprime a proliferação das células endoteliais e o processo de angiogênese. Em estudo realizado por Menendez *et al.* (2005), verificou-se que após a inibição específica da atividade de FASN com C75, ocorre um aumento dose-dependente da expressão de VEGF em células derivadas de câncer de mama, com expressão elevada da oncoproteína ErbB-2. Estes autores demonstraram também que o bloqueio da atividade de FASN ativa a via MAPK e promove um acúmulo proeminente de HIF-1 α nestas mesmas células. Aumento da expressão de VEGF, ativação de MAPK e acúmulo de HIF-1 α também foi observado quando o gene da FASN foi silenciado através de RNAi. Estes achados sugerem que a perturbação do metabolismo endógeno de ácidos graxos das células tumorais desencadeia uma situação que mimetiza a hipóxia, a qual recupera prontamente a cascata MAPK-HIF-1 α -VEGF dependente de ErbB-2. Em conjunto, todas estas observações sugerem que a inibição de FASN pode ser uma nova estratégia para interferir na sobrevivência tumoral, com possível efeito anti-angiogênico. No presente trabalho, investigamos as consequências do bloqueio de FASN na proliferação de células endoteliais e verificamos seus efeitos sobre a expressão de fatores envolvidos no processo de angiogênese.

Em resumo, observamos que orlistat e cerulenina foram capazes de inibir a viabilidade, induzir a apoptose e reduzir *in vitro* a formação de vasos sanguíneos pelas células endoteliais RAEC. Entretanto, células endoteliais HUVEC não tiveram a viabilidade reduzida pelos mesmos tratamentos. Verificamos que a inibição de FASN nas células neoplásicas SK-MEL-25 e SCC-9 aumenta a expressão de RNAs mensageiros com função pró- e anti- angiogênica

e que o meio condicionado por estas células com orlistat reduz a formação *in vitro* de vasos sanguíneos e a proliferação das células HUVEC.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ácido graxo sintase (FASN)

Os ácidos graxos são precursores dos fosfolipídeos das membranas celulares e importantes substratos para o metabolismo energético. As células neoplásicas malignas, em geral, são dependentes de um elevado metabolismo endógeno de ácidos graxos. Devido ao seu alto índice de proliferação, necessitam da produção contínua de ácidos graxos para a síntese das membranas, para a liberação de energia através da β -oxidação lipídica e também para a realização de modificações protéicas pós-traducionais (Menendez *et al.*, 2007).

FASN é uma enzima metabólica com papel central na homeostasia energética, uma vez que converte o excesso de carbono em ácidos graxos para armazenamento. Seu principal produto enzimático é o ácido palmítico, obtido a partir da condensação de malonil-CoA e acetil-CoA, sendo o palmitato responsável pela acilação dos principais reguladores das vias de transdução de sinais. A conformação estrutural de FASN é a de um homodímero de cadeias polipeptídicas longas com massa molecular de 250-270 kDa. Cada polipeptídeo possui sete sítios catalíticos que estão distribuídos a partir da extremidade amino terminal em direção a carboxil terminal na seguinte ordem: β -cetoacil sintase (catalisa a condensação dos resíduos de malonil e acetil com a cadeia de ácido graxo em formação), acetil-CoA e malonil-CoA transacilases (são sítios de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para a subsequente reação de condensação), os sítios desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase e proteína carregadora de acil (atuam como redutores, sobre o produto formado pela β -cetoacil sintase), e por fim o sítio tioesterase localizado na região carboxil terminal (promove a hidrólise do palmitato), os quais atuam em sequência até a liberação da molécula de ácido graxo recém sintetizada (Wakil, 1989; Jayakumar *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2003). Na última década, diversos trabalhos têm demonstrado o importante papel de FASN na sobrevivência das células tumorais. A atividade de FASN é mínima em tecidos normais, exceto em tecidos lipogênicos, uma vez que

a maior parte dos ácidos graxos usados pelas células provém da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Menendez *et al.*, 2005a). Desta forma, a expressão de FASN é baixa ou mesmo ausente na maioria dos tecidos humanos adultos normais (Weiss *et al.*, 1986), com exceção do fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e dos pulmões de recém nascidos onde ocorre a produção da substância surfactante (Kuhajda, 2000; Chirala *et al.*, 2001). Ao contrário, nas células de neoplasias malignas a maior parte dos ácidos graxos provém da síntese endógena, através da atividade de FASN. A expressão de FASN está aumentada em diversos tipos de neoplasias malignas humanas de natureza epitelial, como as mama (Wang *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Bershtein *et al.*, 2009), cólon (Visca *et al.*, 1999; Ogino *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2009; Kearney *et al.*, 2009; Uddin *et al.*, 2009), próstata (Epstein *et al.*, 1995; Swinnen *et al.*, 2000a; Swinnen *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003; Van de Sande *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2006), ovário (Alo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001a; Uddin *et al.*, 2011), endométrio (Pizer *et al.*, 1998b; Tsuji *et al.*, 2004), carcinoma de células renais (Horiguchi *et al.*, 2008), pâncreas (Alo *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Orita *et al.*, 2007; Orita *et al.*, 2008), bexiga (Visca *et al.*, 2003), mieloma múltiplo (Okawa *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008), gliomas (Zhao *et al.*, 2006), glândulas salivares (Ito *et al.*, 2009) carcinomas espinocelulares bucais (CECs) (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008), melanomas (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur, 2005a; Kapur, 2005b; Andrade *et al.*, 2011), além de sarcomas de tecidos moles (Rossi *et al.*, 2006). Em alguns destes tumores, foram realizados estudos imunohistoquímicos que correlacionaram a alta expressão de FASN com uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e conseqüentemente pior prognóstico, como os de próstata (Epstein *et al.*, 1995), ovário (Gansler *et al.*, 1997; Alo *et al.*, 2000), tireóide (Vlad *et al.*, 1999); cólon (Visca *et al.*, 1999; Ogino *et al.*, 2008, Uddin *et al.*, 2009), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005b), sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003),

carcinoma de células renais (Horiguchi et al., 2008) e CECs bucais (Silva *et al.*, 2009). Além do mais, uma associação inversa entre alta expressão de FASN e redução do índice apoptótico foi observada em câncer de próstata (Migita *et al.*, 2009) e co-expressão de FASN com a proteína Caveolina-1 (Cav-1) foi relacionada ao pior prognóstico de pacientes com câncer pancreático (Witkiewicz *et al.*, 2008). Em melanomas, observou-se uma correlação positiva entre expressão de FASN e índice de Breslow, além de uma correlação inversa entre FASN e a sobrevida total (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005). Os dados disponíveis até o momento sugerem que a elevada atividade desta via anabólica gera vantagens para o rápido crescimento celular no câncer (Baron *et al.*, 2004).

Apesar das diversas evidências apontando a síntese endógena de ácidos graxos como essencial para a proliferação de células malignas, não se conhece até o momento quais os mecanismos biológicos envolvidos. Neste contexto, Swinnen *et al.* (2003) demonstraram que a atividade de FASN é necessária para a produção dos fosfolipídios que compõe as membranas das células LNCaP (uma linhagem celular derivada de um adenocarcinoma de próstata metastático). Isto pode causar, além de um aumento na velocidade da produção das membranas celulares, alterações na sua composição lipídica, com possíveis efeitos em várias vias de transdução de sinais (Baron *et al.*, 2004). Como a atividade biológica da FASN está restrita à síntese de ácidos graxos, que está acelerada em células tumorais, esta pode ser um alvo terapêutico para o tratamento de diversos tipos de câncer. Segundo Menendez e Lupu (2007), FASN participa não somente das vias de transdução de sinais, do metabolismo, da regulação da proliferação e sobrevivência de células tumorais, mas também modula a progressão metastática das neoplasias malignas.

2.2. Regulação de FASN

O aumento da síntese de ácidos graxos é causado por múltiplos mecanismos, incluindo a expressão aumentada de enzimas lipogênicas. A biossíntese endógena de ácidos graxos em tecidos normais como fígado e tecido

adiposo é catalisada pela FASN, sendo estimulada pela alta concentração de carboidratos e suprimida pela presença de ácidos graxos na dieta (Fukuda *et al.*, 1999).

Como descrito anteriormente, a expressão elevada de FASN é observada em uma ampla variedade de tumores malignos humanos. Embora os mecanismos responsáveis por este fenômeno não sejam completamente entendidos, de uma maneira geral a expressão de FASN é regulada por fatores de crescimento, hormônio esteróides, e seus respectivos receptores (revisado por Mashima *et al.*, 2009). Fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)-Akt e proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) são vias de sinalização que medeiam expressão de FASN através do fator de transcrição SREBP-1c. SREBPs são proteínas que estimulam a transcrição de FASN quando interagem com sequências específicas do DNA dentro do promotor de FASN (Swinnen *et al.*, 1997b; Swinnen *et al.*, 2000b; Heemers *et al.*, 2001). Está experimentalmente demonstrada a regulação mútua de FASN e do receptor do fator de crescimento ErbB2, o qual induz a expressão de FASN através da sinalização via PI3K (Kumar-Sinha *et al.*, 2003), o qual por sua vez, também depende da expressão FASN (Menendez *et al.*, 2004). Esta regulação foi observada por Menendez *et al.* (2004) em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário, nas quais a inibição (farmacológica ou via RNAi) de FASN suprime a expressão de ErbB2 através da elevação da expressão de PEA3, um repressor da transcrição de ErbB2. Estes efeitos são complexos e envolvem a ativação de múltiplas vias de transdução de sinais, como por exemplo a via de PI3K–Akt (Van De Sande *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). Os fatores de crescimento e seus receptores também afetam a expressão de FASN em células tumorais através da via MAPK, que desencadeia uma cascata de sinais que culmina com a ativação do ciclo celular (Menendez *et al.*, 2005). Está demonstrado que a progesterona estimula a expressão desta enzima em linhagens celulares de câncer de mama (Lacasa *et al.*, 2001), enquanto que andrógenos aumentam a expressão e a atividade de FASN em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata (LNCaP) (Swinnen *et al.*, 1997a; Swinnen *et al.*,

2000a; Myers *et al.*, 2001; Heemers *et al.*, 2001). Os efeitos destes hormônios sobre a expressão de FASN também envolvem a ativação da via de transdução de sinais PI3K–Akt e ERK1/2 (revisado em Lupu & Menendez, 2006). Tanto a testosterona como o EGF são capazes de estimular a expressão gênica de FASN através das proteínas SREBPs, especialmente pela modulação de SREBP1c (Swinnen *et al.*, 1997).

Relatos têm mostrado que a expressão de FASN não é somente controlada por SREBP-1c, mas também por outros fatores de transcrição, tais como as proteínas p53 e proteínas nucleares relacionadas com a lipogênese como SPOT14, altamente expressa em tumores de mama (D'Erchia *et al.*, 2006; Martel *et al.*, 2006). Sabbisetti *et al.* (2009) demonstraram que a expressão de FASN e de p63 (gene homólogo ao supressor de tumor p53) estão associadas, uma vez que o silenciamento de p63 reduz significativamente a produção de RNAs mensageiros e a atividade de FASN. Além destas vias de sinalização intracelular, características do microambiente extracelular também desempenham um papel na regulação de FASN. Os tumores sólidos têm um microambiente caracterizado por hipóxia, baixo pH e falta de nutrientes, que por sua vez induzem a expressão FASN (Menendez *et al.*, 2005; Furuta *et al.*, 2008). Finalmente, a produção de FASN parece ser também regulada pela isopeptidase USP2a (*ubiquitin-specific protease-2a*), que interage e estabiliza a proteína FASN em células de câncer de próstata (Graner *et al.*, 2004).

2.3. Inibidores de FASN

A inibição da enzima FASN como uma possível forma terapêutica para o câncer tem sido estudada em diversas linhagens celulares. Existem diferentes compostos inibidores da atividade de FASN. A cerulenina e seu análogo sintético c75, orlistat e o triclosan têm sido usados experimentalmente em diversos trabalhos (Menendez *et al.*, 2007). Outros inibidores sintéticos da atividade de FASN, como C93, C247, FAS31 também têm sido estudados com a finalidade de

suprimir deficiências como toxicidade e bioviabilidade oral de seus análogos (revisado por Flavin *et al.*, 2011).

A cerulenina ([2R,3S]-2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida) é um produto natural do fungo “*Cephalosporium caerulens*”, conhecida desde 1960 por possuir propriedades antifúngicas. É um inibidor da síntese de ácidos graxos por bloquear irreversivelmente a atividade de FASN (Omura, 1976; Pizer *et al.*, 1996) através de uma ligação covalente no sítio catalítico β -cetoacil sintase (Kuhajda *et al.*, 2000). Por ser instável, a aplicação clínica da cerulenina é limitada. C75 é uma pequena molécula sintética com cadeia de 7 carbonos (α -metileno- γ -butirolactona) que possui efeitos inibitórios sobre a atividade da FASN comparáveis aos da cerulenina, sendo mais estável do que esta última e apresentando, portanto, melhor efeito em experimentos *in vivo* (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

Tanto a cerulenina como o c75 causam significativa inibição da progressão do ciclo celular, bloqueando a passagem das fases G0/G1 para a fase S em linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas humanas (Pizer *et al.*, 1996; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998b; Kuhajda, 2000; Li *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003). A inibição da atividade de FASN causa ainda, em células malignas, um aumento na taxa de morte por apoptose (Li *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 2008). Menendez *et al.* (2004) demonstraram, num estudo com linhagens derivadas de câncer de mama e ovário, que a inibição de FASN com cerulenina ou c75 leva a uma diminuição da expressão da oncoproteína ErbB2. O tratamento com estes inibidores causa também a redução no tamanho de tumores em modelos xenográficos através da injeção de células derivadas de câncer de ovário humano (OVCAR-3) no peritônio de camundongos (Pizer *et al.*, 1998a). Os mesmos autores (Pizer *et al.*, 2000) relataram uma acentuada redução da síntese de ácidos graxos e do volume tumoral, além de aumento da taxa de apoptose, em camundongos que receberam implantes subcutâneos de células derivadas de câncer de mama (MCF7), após tratamento com c75. Gabrielson *et al.* (2001) demonstraram efeito semelhante em modelo xenográfico de mesotelioma, com

células H-Meso. Alli *et al.* (2005) observaram que camundongos transgênicos *neu-N*, que têm expressão forçada de ErbB2 e desenvolvem câncer de mama de forma espontânea, apresentaram significativa diminuição no aparecimento dos tumores quando tratados com c75 (de 50% para 20%), o que sugere um efeito quimiopreventivo.

Orlistat (tetrahidrolipstatin, comercializado pela Roche como Xenical) é um derivado semi-sintético da lipstatina já aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA) para o tratamento da obesidade por inibir irreversivelmente a ação de lipases gástricas e pancreáticas (Guerciolini *et al.*, 1997). Esta droga também é capaz de bloquear a função tioesterase da FASN, responsável pela liberação do palmitato (Kridel *et al.*, 2004), fato que rapidamente foi associado a um efeito anti-proliferativo em células de câncer de mama e próstata e anti-tumoral em modelo xenográfico de câncer de próstata (Menendez *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 2004). Browne *et al.* (2006) inibiram a atividade de FASN com orlistat em células endoteliais de vasos sanguíneos e observaram redução na proliferação, o que foi atribuído à redução da expressão do receptor VEGFR-2 na superfície celular. Menendez *et al.* (2004, 2005c) demonstraram que o tratamento de células derivadas de carcinoma de mama (SK-Br3) e de estômago (NCI-N87) com orlistat causa, além da inibição da síntese de ácidos graxos, um bloqueio do ciclo celular nas fases G0/G1, além de aumentar o índice apoptótico. Menendez *et al.* (2004) mostraram que inibição de FASN com orlistat ou com RNAi diminui a expressão do receptor de superfície ErbB2 em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário, além de aumentar os níveis de p27^{Kip1}. Em estudo realizado por nosso grupo (Carvalho *et al.*, 2008), células B16-F10 foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos C57Bl6 e resultaram no desenvolvimento de metástases espontâneas para os linfonodos mediastínicos em 100% dos casos. O tratamento destes animais com orlistat reduziu pela metade o número de linfonodos afetados e inibiu a proliferação das células de melanoma em cultura, com bloqueio da passagem para a fase S do ciclo celular.

Apesar de muito promissores, os estudos que visam à inibição farmacológica de FASN como uma forma de quimioterapia para o tratamento de neoplasias malignas devem ser interpretados com cuidado. Está demonstrado que o bloqueio de FASN *in vivo* pode causar efeitos colaterais como anorexia e perda de peso (Clegg *et al.*, 2002), além de apresentar potencial efeito teratogênico (Chirala *et al.*, 2003). Além do mais, um estudo do nosso grupo mostrou que cerulenina é capaz de inibir o crescimento de fibroblastos humanos normais em culturas primárias (Almeida *et al.*, 2005), sugerindo que a produção endógena de ácidos graxos não seja essencial somente para as células malignas.

2.4 Efeitos biológicos da inibição de FASN

Embora os mecanismos através dos quais o bloqueio de FASN induz a morte celular em células neoplásicas ainda sejam desconhecidos em grande parte, várias possibilidades têm sido propostas. Estudos preliminares indicam que a inibição de FASN provoca acúmulo do metabólito intermediário malonil-CoA, o qual induz apoptose pelo seu próprio efeito citotóxico e por bloquear a oxidação de ácidos graxos (Pizer *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Thupari *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003). Outros estudos sugerem que a falta de ácido graxo pode ser um fator crítico para a indução da apoptose. Chajes *et al.* (2006) observaram que durante o cultivo de células neoplásicas com expressão diminuída das enzimas Acetil-CoA carboxilase e FASN ocorrem altos índices apoptóticos, o que não acontece quando ácido palmítico é acrescentado ao meio de cultura. Segundo Pizer *et al.* (1998a), o efeito citotóxico da inibição de FASN não se deve a uma ação direta no DNA ou na maquinaria de replicação e envolve a função de p53, o qual foi relacionado a perturbações na síntese de ácidos graxos (Li *et al.*, 2001). Entretanto, o efeito citotóxico decorrente do bloqueio de FASN pode ocorrer de maneira independente de p53, através da ativação direta de sinais apoptóticos como a alta expressão de Bax, liberação do citocromo C e ativação de caspases (Heiligtag *et al.*, 2002). Bandyopadhyay *et al.* (2006) inibiram a expressão de FASN através de RNAi em células de câncer de mama, o que levou a um acúmulo

de malonil-CoA e consequente inibição da enzima de membrana mitocondrial CPT-1. Esta última é responsável pela transesterificação dos ácidos graxos de cadeia longa (na forma de acil-CoAs) em acil-carnitina, permitindo a entrada destes na mitocôndria para serem oxidados. Também foi verificado um aumento do lipídio ceramida, que está relacionado a respostas apoptóticas celulares mediadas por indutores de apoptose, como FAS/FAS ligante, TNF- α (fator de necrose tumoral α), fatores de crescimento, hipóxia e danos ao DNA. Foi observado ainda que a inibição de FASN promove aumento na expressão de genes pró-apoptóticos como BNIP3, TRAIL e DAPK2. Estudos mostram que a perturbação na atividade enzimática de FASN induz estresse no retículo endoplasmático das células tumorais, as quais respondem com a ativação do processo autofágico, sugerindo uma relação entre a autofagia e a lipogênese tumoral (Little *et al.*, 2007; Buzzai *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2007).

Estudos recentes do nosso laboratório têm demonstrado que a inibição de FASN com orlistat ou cerulenina em células de melanoma murino B16F10 inibe a proliferação e induz morte por apoptose, com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3. Neste estudo, observou-se que a morte celular induzida por orlistat é precedida por estresse oxidativo (aumento de espécies reativas de oxigênio - EROs e [Ca²⁺]_{cit}) e é independente da participação de p53, calcineurina ou da abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Zecchin *et al.*, 2011). Como mencionado anteriormente, Browne *et al.* (2006) mostraram que orlistat suprime a proliferação das células endoteliais e a angiogênese. Em nossa dissertação de mestrado, observamos que o tratamento com orlistat foi capaz de diminuir significativamente a quantidade de vasos sanguíneos induzidos por melanomas experimentais. Finalmente, a expressão forçada de FASN confere resistência aos quimioterápicos adriamicina e mitoxantrona em células de câncer de mama (Liu *et al.*, 2008) e em células de câncer de pâncreas aumenta significativamente a resistência à radiação e ao quimioterápico gemcitabina (Yang *et al.*, 2011). Em conjunto, todas estas

observações sugerem que a inibição de FASN pode ser uma nova estratégia para interferir na sobrevivência tumoral, com possível participação de um efeito anti-angiogênico.

2.5. Angiogênese tumoral

Mesmo com todas as alterações genéticas que permitem o crescimento desordenado e a sobrevivência das células malignas, os tumores não conseguem ter mais do que 1 ou 2 mm de diâmetro, a menos que sejam vascularizados (Folkman, 2002). Assim como em tecidos normais, a angiogênese tumoral pode ocorrer pela mobilização de células precursoras ou pelo desenvolvimento dos capilares já existentes (Carmeliet *et al.*, 2001), no entanto, os vasos sanguíneos formados diferem dos normais por serem tortuosos, irregulares e permeáveis (Jain, 2003; McDonald *et al.*, 2003).

As fases mais iniciais do crescimento das neoplasias malignas não estimulam a angiogênese, portanto estas podem permanecer “dormentes” por meses ou anos, até que algumas de suas células tumorais adquiram um fenótipo angiogênico (revisado por Berger & Benjamin, 2003). A mudança para o fenótipo angiogênico depende do equilíbrio entre fatores pró- ou anti-angiogênicos. Os tumores podem adquirir o fenótipo angiogênico: 1 – produzindo fatores angiogênicos, 2 – ativando células do estroma, como fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos, recrutados do tecido adjacente ou de tecidos não-tumorais mais distantes; 3 – utilizando fatores angiogênicos aprisionados na matriz extracelular (MEC) e 4 – pela geração de novos epítomos na MEC que promovem angiogênese.

Os fatores angiogênicos VEGF e FGF são liberados pelo tumor, pelas células inflamatórias que infiltram os tumores (como os macrófagos) e pelo próprio estroma tumoral (Ferrara, 2003). As células do estroma podem contribuir com sinais positivos ou negativos para o desenvolvimento tumoral, além de favorecerem a resistência às terapias citotóxicas (Joyce, 2005, Sparmann & Bar-Sagi, 2004; Albin *et al.*, 2005; Karin, 2005). Albin & Sporn (2007) relataram, em

trabalho de revisão, que disfunções nas células do estroma durante os estágios precoces do crescimento do mesmo, associadas às alterações que ocorrem nas células malignas propriamente ditas, são cruciais para a sobrevivência do tumor. Portanto, pode-se considerar o “microambiente” como parte integral de uma neoplasia, sendo este formado por células endoteliais e seus precursores, pericitos, células musculares lisas, fibroblastos de fenótipos variados, miofibroblastos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos T, B e “natural killer”, além de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. Os sistemas sanguíneos e linfáticos, bem como os componentes da matriz extracelular, também fazem parte do microambiente tumoral (revisado por Onimaru & Yonemitsu, 2011).

Devido a importância da neoformação vascular no desenvolvimento tumoral, muitos estudos têm avaliado os agentes anti-angiogênicos. O primeiro inibidor angiogênico descrito foi a trombospondina-1, que modula a proliferação de células endoteliais e sua mobilidade (Volpert *et al.*, 1995). Surpreendentemente, muitas moléculas inibitórias, tais como as "estatinas", são derivadas de proteínas maiores que não têm efeito sobre a angiogênese. Entre elas estão a angiostatina (um fragmento do plasminogênio que liga a anexina II e a ATP sintase), endostatina, tumstatina e canstatina, os quais são fragmentos de colágenos que se ligam a integrinas (revisado por Kalluri *et al.*, 2002; O'Reily *et al.*, 1997a; O'Reily *et al.*, 1997b; Maeshima *et al.*, 2001; Kamphaus *et al.*, 2001).

Outro grupo de inibidores da angiogênese é formado por drogas antagonistas ao VEGF ou VEGFR-2. O tratamento com estes inibidores geralmente prolonga a sobrevivência dos pacientes com câncer por alguns meses. A FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso dos anticorpos anti-VEGF, bevacizumab (Avastin) para câncer colorretal metastático, câncer de mama metastático, glioblastoma multiforme recorrente (GMR), carcinoma de células renais (CCR), câncer de pulmão metastático de células não pequenas e de células não escamosas. Além disso, existem drogas antagonistas de VEGFR-2, já aprovada para uso clínico, como o sorafenib (Nexavar) para carcinoma renal

metastático e carcinoma hepatocelular irresssecável e sunitinib (Sutent) e pazopanib (Votrient) para carcinoma renal metastático. Recentemente, vandetanib (Zactima) foi aprovado para o carcinoma medular da tiróide metastático e sunitinib foi recomendado para aprovação em tumores neuroendócrinos do pâncreas avançado, mas os resultados clínicos ainda não foram publicados (revisado por Carmeliet e Jain, 2011a).

Estudos recentes demonstram que o tratamento com bloqueadores de VEGF ou de seus receptores leva a “normalização” da vasculatura tumoral, a qual consiste na maturação de vasos, tornando-os menos tortuosos e permeáveis, reduzindo a pressão do fluido intersticial, aumentando a oxigenação e a perfusão e, conseqüentemente, a penetração das drogas no tumor (Tong *et al.*, 2004, Kamoun *et al.*, 2009, Dickson *et al.*, 2007, Taylor *et al.*, 2010). Entretanto, apesar de promissoras, as terapias anti-angiogênicas que visam danificar a vasculatura tumoral e inibir a angiogênese parecem ser de curta duração e desenvolver resistência em alguns pacientes (Ebos *et al.*, 2009, Ribatti *et al.*, 2010). Em trabalho de revisão, Carmeliet e Jain (2011b) sugerem que existe benefício transiente no tratamento com inibidores de VEGF, que ocorre durante a normalização da vasculatura. Depois disto, com o uso prolongado, ocorre redução dos vasos tumorais e, paralelamente, as células tumorais ativam uma via angiogênica alternativa. Estes mesmos autores consideram o período de normalização vascular como um benefício para a terapia contra o câncer, uma vez que tumores oxigenados são mais sensíveis à radioterapia e os vasos funcionantes mais efetivos para levar quimioterápicos para dentro dos tumores.

2.6. VEGF

O controle molecular do processo de angiogênese é complexo e centralizado no fator VEGF (Ferrara *et al.*, 2002). O crescimento dos vasos sanguíneos para responder às necessidades do tecido depende da produção e secreção de VEGF, que é estimulada pela falta de oxigênio. Na hipóxia ou em resposta aos fatores TGF- α , TGF- β e PDGF, ocorre um aumento intracelular de

HIF-1 α , que por sua vez estimula a transcrição do gene que codifica VEGFA, cujo produto protéico difunde-se pelos tecidos e atua sobre seus receptores presentes na superfície das células endoteliais.

Sob a denominação de VEGF, encontra-se uma família de 7 membros, formada por PLGF, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE e VEGFF. VEGFA (VEGF) é o principal regulador do crescimento dos vasos sanguíneos, ao passo que VEGFC e VEGFD regulam a linfangiogênese (Karkkainen *et al.*, 2002). Além de ser mitógeno para células endoteliais, VEGFA também tem importante efeito sobre a permeabilidade vascular e quimiotaxia de células derivadas da medula óssea ou monócitos (Clauss *et al.*, 1990). Este fator se liga aos receptores VEGFR-1 ou VEGFR-2 e aos co-receptores NRP1 e NRP2 (Karkkainen *et al.*, 2002). Existem evidências de que VEGFR-2 é o mais importante mediador da mitogênese e sobrevida das células endoteliais, bem como da permeabilidade vascular durante a angiogênese. Em contraste, VEGFR-1 não medeia sinais mitogênicos e pode, especialmente durante o desenvolvimento embrionário, inibir a proliferação endotelial através do seqüestro de VEGFA (Ferrara *et al.*, 2003). VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos por células endoteliais vasculares e células tumorais (Kowanetz e Ferrara, 2006).

2.7. Isoformas de VEGFA

O gene humano que codifica VEGF reside no cromossomo 6p21.3 e possui 8 exons (Vincenti, *et al.*, 1996; Tisher *et al.*, 1991). Através de *splicing* alternativo, o gene *VEGFA* produz proteínas variantes com atividade pró-angiogênica, como VEGFA₂₀₆, VEGFA₁₈₉, VEGFA₁₈₃, VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₄₈, VEGFA₁₄₅, e VEGFA₁₂₁ (Ferrara *et al.*, 1997; Houck *et al.*, 1991) ou anti-angiogênicas, como VEGFA_{189b}, VEGFA_{183b}, VEGFA_{165b}, VEGFA_{145b} e VEGFA_{121b} (Woolard *et al.*, 2004). Os exons 1 a 5 e 8 estão preservados em todas as variantes, enquanto a utilização ou não dos exons 6a, 6b, e 7 resulta nas isoformas distintas (Figura 1). Na isoforma 121 faltam os exons 6 e 7 (Ferrara *et al.*, 1997) e na 165 o exon 7 está ausente, ao passo que a variante 148 tem a

mesma seqüência de aminoácidos da 165 menos 35 pares de base no final do exon 7 (Whittle *et al.*,1999). Os mensageiros da isoforma 189 possuem os exons 6 e 7 (Ferrara *et al.*, 1997), enquanto que os da 183 perdem 18 pares de base do exon 6 (Lei *et al.*, 1998). VEGFA₁₄₅ contêm o exon 6a mas não o exon 7 (Poltorak *et al.*, 1997) e as variantes 206 são as mais extensas, contendo além de exons 6 e 7, mais 51 pares de base do intron 3 (Houck *et al.*, 1991).

As isoformas de VEGF diferem na sua capacidade de interação com heparan sulfato e heparina na matriz extracelular, bem como na afinidade com seus receptores (Neufeld *et al.*, 1999). VEGFA₁₂₁ é muito solúvel por não se ligar a heparina, ao contrário de VEGFA₁₆₅ que quando secretado, se mantém ligado à superfície da célula ou à matriz extracelular (Park *et al.*, 1993). Já VEGFA₁₈₉ tem maior afinidade à heparina e, portanto, permanece fortemente associado à superfície celular ou à matriz extracelular. Entretanto, todos eles se ligam a VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR/Flk-1) (Waltenberger *et al.*, 1994; Carmeliet *et al.*,1999), sendo a interação com o último reforçada por NRP-1 (Soker *et al.*,1998). O balanço da expressão destas isoformas parece ser importante tanto na angiogênese fisiológica como patológica.

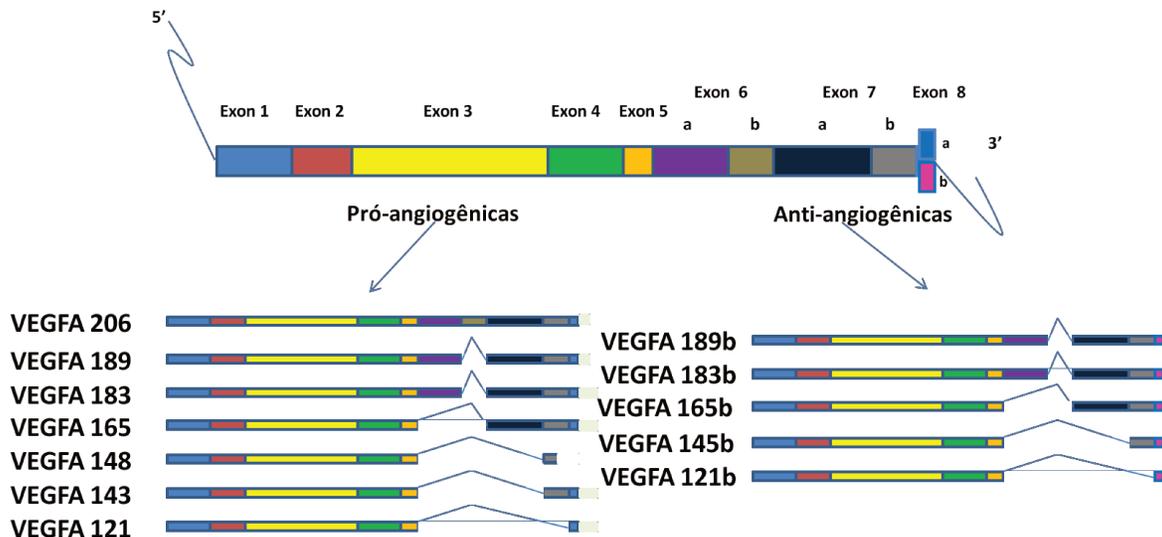


Figura 1- Estrutura dos RNAs mensageiros das isoformas de VEGFA. O gene é composto por 8 exons e o *splicing* alternativo entre os exons 6, 7 e 8 é capaz de gerar as múltiplas isoformas.

2.8. VEGFA em neoplasias malignas

O VEGF tem expressão elevada na maioria dos tumores humanos (Ferrara *et al.*, 1997), incluindo o melanoma (Potgens *et al.*, 1995; Rennel *et al.*, 2008). No entanto, a expressão de cada isoforma é variável. Por exemplo, em câncer de mama (Zhang *et al.*, 1995) e melanomas (Potgens *et al.*, 1995; Redondo *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002) a forma aparentemente predominante é VEGFA₁₂₁, enquanto que a variante 165 é encontrada em grande quantidade nos glioblastomas (Berkman *et al.*, 1993). Cheung *et al.* (1998) mostraram que, em carcinoma pulmonar, a progressão da doença está associada com a expressão de VEGFA₁₈₉. A expressão forçada de VEGFA₁₂₁ e VEGFA₁₆₅ em células WM1341B (derivadas de melanoma humano em estágio inicial) resultou em um crescimento agressivo de tumores experimentais, o que não aconteceu com VEGFA₁₈₉ (Yu *et al.*, 2002). Alterações no *splicing* de VEGF têm sido detectadas durante a carcinogênese em pele na presença do v-oncogene H-ras (Tober *et al.*, 1998). Em estudos imunohistoquímicos, a alta expressão de VEGFA foi associada com a progressão dos melanomas (Bryehtova *et al.*, 2008; Einspahr *et al.*, 2007) e o aumento da expressão desta proteína parece ser um indicador de transformação de nevos displásicos em melanoma (Einspahr *et al.*, 2007).

VEGFA_{165b} é fracamente expresso em melanoma metastático (Pritchard-Jones *et al.*, 2007) e em carcinoma de próstata (Woolard *et al.*, 2004) e de rim (Bates *et al.*, 2002). A expressão forçada de VEGFA_{165b} em células de sarcoma de Ewing reduziu o crescimento tumoral em camundongos, assim como a proliferação e migração endotelial em meio condicionado por estas células (Rennel *et al.*, 2008). O mecanismo pelo qual as isoformas anti-angiogênicas de VEGF limitam o crescimento tumoral ainda não está elucidado, contudo, está claro que VEGFA_{165b} é capaz de se ligar tanto a VEGFR-1 (Cebe *et al.*, 2006) como VEGFR-2 (Woolard *et al.*, 2004), desencadeando fraca sinalização (Woolard *et al.*, 2004; Cebe *et al.*, 2006). De fato, Rennel *et al.* (2009) verificaram que VEGFA_{121b} é capaz de se ligar com a mesma afinidade que as variantes pró-angiogênicas ao

receptor VEGFR-2, porém inibindo a migração e atuando como um citoprotetor de células endoteliais. É importante ressaltar que, apesar de descritos como anti-angiogênicos, as isoformas VEGFA_{165b} e VEGFA_{121b} são capazes de estimular a proliferação de células endoteliais de maneira menos intensa que as variantes pró-angiogênicas, o que levou os autores a sugerirem a nomenclatura fracamente angiogênica (Catena *et al.*, 2010).

2.9. Atividade de VEGFA e FASN

A alta expressão do oncogene ErbB-2 está associada com progressão tumoral acelerada e desenvolvimento de metástases e *FASN* é um dos genes regulados por ErbB-2 nas etapas de transcrição e tradução. Como descrito anteriormente, a inibição de *FASN* reduz especificamente a expressão de ErbB-2 e sua atividade tirosina-quinase em células de câncer de mama e ovário. A alta expressão de ErbB-2 está também relacionada com expressão aumentada HIF-1 α , fator de transcrição que regula a expressão de vários genes, incluindo o *VEGF*.

Em estudo realizado por Menendez *et al.* (2005), a inibição específica da atividade de *FASN* com C75 ocasionou um forte aumento dose-dependente da expressão de VEGF (acima de 500%) em células de câncer de mama com expressão elevada de ErbB-2. Ao mesmo tempo, o bloqueio da atividade de *FASN* ativou drasticamente a via MAPK e promoveu um acúmulo de HIF-1 α nestas mesmas células. Além disso, a inibição da atividade de MAPK como o inibidor específico U0126 aboliu tanto o acúmulo de HIF-1 α como a expressão de VEGF induzidas por C75. Os mesmos efeitos foram observados quando o gene que codifica *FASN* foi silenciado através de siRNA. Em conjunto, estes achados sugerem que a perturbação do metabolismo endógeno de ácidos graxos das células tumorais desencadeia uma condição “hipóxia-like” que recupera prontamente a cascata MAPK-HIF-1 α -VEGF dependente de ErbB-2. Estes resultados mostram também que existe uma conexão entre o metabolismo endógeno de ácidos graxos catalizado por *FASN* e HIF-1 α , o que pode ser uma

adaptação metabólica das células tumorais com alta expressão de ErbB-2 para sobreviver em ambientes hipóxicos (Menendez *et al.*, 2005).

Browne *et al.* (2006) demonstraram que orlistat inibe FASN nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, bloqueando a síntese de ácidos graxos e prevenindo a sua proliferação. Os mesmos autores mostram que orlistat inibe a neovascularização humana em ensaio *ex vivo*, sugerindo que esta pode ser uma potente droga anti-angiogênica por impedir a expressão do VEGFR-2 na superfície das células endoteliais. De fato, em nossa dissertação de mestrado, verificamos que o tratamento com orlistat reduziu significativamente a angiogênese induzida por melanomas experimentais e que, nestes mesmos tumores, houve aumento da expressão de RNAs mensageiros para VEGFA. No presente trabalho, buscamos compreender o efeito dos fatores de VEGFA produzidos pelas células neoplásicas pelo tratamento com orlistat sobre a proliferação de células endoteliais.

3.OBJETIVOS

3.1. Estudar os efeitos da cerulenina e do orlistat sobre a viabilidade, proliferação e apoptose das células RAEC. Estudar o efeito destes compostos sobre a formação de estruturas vasculares *in vitro*.

3.2. Estudar os efeitos do meio condicionado por células B16-F10, SK-MEL-25 e SCC-9 sobre a proliferação das células RAEC e HUVEC e sobre a formação de estruturas vasculares *in vitro*.

3.3. Verificar os efeitos da cerulenina e do orlistat sobre a expressão de VEGFA total em células B16-F10, SK-MEL-25 e SCC-9. Estudar a expressão das isoformas pró e anti-angiogênicas de VEGFA nas células SK-MEL-25 e SCC-9.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

As linhagens celulares SCC-9, provenientes de CECs bucais humanos, B16-F10 e SK-MEL-25 derivadas de melanoma murino e humano, respectivamente, foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, E.U.A.). As células HUVEC foram isoladas a partir de culturas primárias de cordões umbilicais humanos e gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Ana Marisa Chudzinski-Tavassi (Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan). A linhagem celular RAEC, derivada do endotélio de aorta de coelho, foi gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Helena B. Nader (Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Ciências Biomédicas da Unifesp). O cultivo foi realizado em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (NUNC, E.U.A.) com os meios de cultura DMEM/F-12 (SCC-9), RPMI (SK-MEL-25 e B16-F10), HAM-F12 (RAEC) (Invitrogen, E.U.A.), todos suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen) na diluição de 1:100, a 37 °C e em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

O subcultivo foi realizado quando as culturas atingiam uma confluência cerca de 70%. Para isto, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e então incubadas a 37°C com de tripsina a 2%, para as linhagens B16-F10, SK-MEL-25, SCC-9 e HUVEC, ou pancreatina a 10% (SIGMA, E.U.A.), para a linhagem RAEC. Após um período que variou de 1 a 3 minutos para tripsina e de 20 a 30 minutos para a pancreatina, as células ficavam separadas da superfície do frasco de cultura (que foi determinado por observação em microscópio de contraste de fase), sendo então a ação da tripsina ou da pancreatina interrompida pela adição de 5 ml (frasco de 25 cm²) ou 10 ml (frasco de 75 cm²) de meio de cultura contendo 10% de FBS. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning, E.U.A.) e estes centrifugados a 800 xg por 3 minutos. O sobrenadante foi removido e descartado e os “pellets” de células ressuspensos

em 5 ml de meio de cultura com 10% de FBS, as células contadas e replaqueadas em novos frascos de cultura. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Visando manter o estoque congelado em nitrogênio líquido e trabalhar sempre com as células em passagens semelhantes, congelamos várias amostras de cada linhagem celular antes da realização dos experimentos. Para isto, as células foram suspensas em solução 1/1 contendo 20% de di-metil sulfóxido (DMSO, Sigma, E.U.A.) e RPMI 1640 ou HAM-F12 com 50% de FBS e congeladas em nitrogênio líquido. Para descongelar as células, os criotubos (NUNC, Dinamarca) foram colocados em banho de água a 37°C e, após rápido descongelamento, transferidas para tubos de 15 ml contendo 10 ml de meio e centrifugadas. Os “pellets” foram então ressuspensos em 5 ml de meio de cultura e as células plaqueadas para realização dos experimentos. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as linhagens subcultivadas no máximo por dez passagens e então descartadas. Todos os experimentos apresentados neste trabalho foram feitos com o mesmo lote de FBS, para evitar variações indesejáveis no padrão de crescimento celular decorrentes de sua composição.

4.2. Preparo das soluções de orlistat e cerulenina

O composto ativo do orlistat (Xenical, Roche, Suíça) foi extraído de acordo com Knowles *et al.* (2004), dissolvendo-se o conteúdo de uma cápsula em 1 ml de etanol absoluto (Merck, Alemanha), seguido de agitação por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a solução foi centrifugada a 16.000 xg por 5 minutos e o sobrenadante coletado e estocado a -80°C até o momento do uso. A cerulenina (Sigma, E.U.A.) foi dissolvida em DMSO na concentração de estoque de 20 mg/ml e armazenada a -20°C.

4.3. Silenciamento de *FASN* através de siRNA

As moléculas de siRNA foram sintetizadas, aneladas e purificadas pelo fabricante (Stealth RNAi, Invitrogen). Através do software BLOCK-iT™ RNAi

Designer três sequências específicas para o gene de *FASN* murino (NM_00798) foram selecionadas: (5' CAA TGA TGG CCA ACC GGC TCT CTT T 3'), (5' TGG GAA GAC CCG AAC TCC AAG TTA T 3') e (5' CCT CTG GGC ATG GCT ATC TTC TTG A 3') da mesma maneira, uma sequência para *FASN* humano (NM_004104_stealth_158) foi escolhida: (5' CAG AGU CGG AGA ACU UGC AGG AGU U 3'). As linhagens celulares B16-F10, SK-MEL-25 e SCC-9 foram crescidas até atingirem 50% de confluência e as células B16-F10 transfectadas com 200 nM da sequência de siRNA através de lipossomos (Lipofectamine 2000, Invitrogen, 3 µl/ml), de acordo com as instruções do fabricante. As células SCC-9 e SK-MEL-25 foram transfectadas com 50 nM da sequência de siRNA com o auxílio de polímero (jetPRIME, Polyplus transfection, 2 µl/ml), de acordo com as instruções do fabricante. Como controle negativo, as células foram transfectadas com concentrações equivalentes de uma sequência de siRNA não específica (Stealth RNAi Negative Control Duplexes, Invitrogen). As transfecções foram realizadas em placas de 100 mm e as células coletadas para a avaliação da inibição de *FASN* em 48 horas após a transfecção. A inibição de *FASN* foi avaliada por western blot como descrito por Carvalho *et al.* (2008), com anticorpos específicos anti-*FASN* e anti-β-actina na diluição de 1:3.000 e 1:60:000 respectivamente.

4.4. Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada utilizando 3 - (4,5-dimetil-2-yl) -2,5 difeniltertrazolim brometo (MTT, Sigma). Para isto, foram plaqueadas 4×10^3 células RAEC ou 6×10^4 células HUVEC em cada poço de placas de 6 poços em 2ml de meio HAM-F12 ou RMPI, ambos suplementados com 10% de FBS. Após 24 horas do plaqueamento, se iniciou o tratamento com orlistat a 25, 50, 100, 200 e 300 µM (ou etanol como controle) e cerulenina a 0,35, 0,75, 1, 1,5 e 2 µg/ml (ou DMSO como controle). As células foram então lavadas em PBS, tripsinizadas e incubadas com 2,5 mg/ml de MTT diluído em PBS a 37 °C por 3 horas. Depois disso, etanol absoluto foi adicionado para dissolver os precipitados. Após homogeneização, os sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços e

as absorbâncias determinadas em um leitor de ELISA (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) ajustado para 490 nm.

4.5. Avaliação das taxas de morte celular por apoptose e ciclo celular

A porcentagem das células em apoptose foi determinada por citometria de fluxo. Para isto, foram plaqueadas 4×10^4 células RAEC em placas de 6 poços em meio HAM-F12 suplementado com 10% FBS. Após 24 horas do plaqueamento, iniciou-se o tratamento com orlistat a 100 μM ou cerulenina a 0,75 $\mu\text{g/ml}$ (etanol ou DMSO foram utilizados como controle). Após os tratamentos com os inibidores de FASN, as células foram incubadas com Anexina V-FITC (1:500) 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 , por 20 minutos a temperatura ambiente e analisadas em citômetro de fluxo, em canal FL1. A aquisição dos dados foi feita em um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e a análise por meio do programa CellQuest (Becton Dickinson) com o auxílio da Profa. Dra. Michelle Agostini. Dez mil eventos foram analisados para cada amostra.

Para a análise da distribuição das células dentro das fases do ciclo celular, foram plaqueadas 4×10^4 células RAEC em placas de 6 poços em meio HAM-F12 suplementado com 10% FBS. Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi substituído por HAM-F12 sem FBS e as células incubadas por mais 24 horas, quando então se iniciou o tratamento com orlistat a 100 μM e etanol como controle ou cerulenina a 0,70 $\mu\text{g/ml}$ ou DMSO como controle, novamente em meio contendo suplemento com 10% de FBS. As células foram coletadas depois de 48, 72 e 96 horas, fixadas com etanol a 70% gelado, colocadas a -20°C por 12 horas, lavadas em PBS gelado e tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de RNase durante 1 hora a 37°C . Após incubação com 50 $\mu\text{g/ml}$ de iodeto de propídeo a 4°C , a distribuição das células no ciclo celular foi analisada utilizando-se o software CellQuest em um citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio. Dez mil eventos foram analisados para cada amostra.

4.6. Análise da proliferação das células RAEC cultivadas em meio condicionado pelas células B16-F10

O efeito de fatores produzidos e secretados por células de melanoma sobre o crescimento das células RAEC foi analisado através de ensaios com meio condicionado. Para isto, foram plaqueadas 4×10^4 células RAEC por poço de placas de cultura de 6 poços em meio HAM-F12 suplementado com 10% FBS. Após 24 horas, as células foram incubadas com 1,6 ml de meio RPMI suplementado com 10% FBS metabolizado durante um período de 24 horas por aproximadamente 3×10^4 células B16-F10, acrescentado 0,4 ml de meio HAM-F12 suplementado com 10% de FSB (80% de meio condicionado, 20% de meio fresco). Como controle, utilizou-se 1,6 ml de meio HAM-F12 suplementado em 10% FBS metabolizado por cerca de 1×10^6 células RAEC durante um período de 24 horas, acrescido de 0,4 ml de HAM-F12 novo suplementado com 10% de FBS (80% de meio condicionado, 20% de meio fresco). Para estimar o número de células, estas foram coletadas depois de 24 e 48 horas e contadas utilizando uma câmara de Neubauer.

4.7. Análise da proliferação das células HUVEC cultivadas em meio condicionado pelas células SK-MEL-25 ou SCC-9

O efeito de fatores secretados por células neoplásicas humanas sobre o crescimento das células HUVEC foi avaliado em ensaios com meio condicionado. Para isto, foram plaqueadas 6×10^4 células HUVEC por poço de placas de cultura de 6 poços em meio RPMI suplementado com 10% FBS. Após 24 horas do plaqueamento, se iniciou incubação com 1,6 ml de meio RPMI suplementado com 10% FBS condicionado pelo mesmo período de tempo por aproximadamente 6×10^4 células SK-MEL-25, ou com 1,6 ml de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% FBS condicionado por um período de 48 horas por aproximadamente 6×10^4 células SCC-9, acrescentados 0,4 ml de meio RPMI fresco suplementado com 10% de FSB (80% de meio condicionado, 20% de meio fresco). Como controle, utilizou-se 1,6 ml de meio RPMI suplementado em 10% FBS metabolizado por

cerca de 1×10^6 células HUVEC por um período de 48 horas acrescido de 0,4 ml de RPMI novo suplementado com 10% de FBS (80% de meio condicionado, 20% de meio fresco). As taxas de proliferação foram obtidas pela contagem em câmara de Neubauer.

4.8. Análise da proliferação das células RAEC e HUVEC em meio condicionado pelas células B16-F10, SK-MEL-25 ou SCC-9 tratadas com orlistat

Para verificar se o orlistat é capaz de regular a produção de VEGFAs com função anti- ou pró- angiogênica em células neoplásicas, estudamos o crescimento das células RAEC e HUVEC em meio condicionado por células de melanoma (B16-F10 ou SK-MEL-25) ou de carcinoma espinocelular bucal (SCC-9) tratadas com orlistat por 48 horas. Para isto, as células RAEC e HUVEC, foram semeadas em placas de cultura de 6 poços em meio HAM-F12 e RPMI suplementados com 10% FBS. Após 24 horas, o meio foi substituído por 1,6 ml de meio HAM-F12 ou RPMI, respectivamente, suplementados com 10% FBS condicionado por um período de 24 ou 48 horas por células B16-F10, SK-MEL-25 ou SCC-9 tratadas com 300 μ M de orlistat, acrescentado 0,4 ml do respectivo meio novo suplementado com 10% de FBS (80% meio condicionado, 20% meio fresco). Como controle, utilizamos meio de cultura condicionado pelas mesmas células tratadas com etanol. As taxas de proliferação foram obtidas pela contagem em câmara de Neubauer.

4.9. Ensaio *in vitro* de formação de estruturas vasculares (“vessel-like”)

Para avaliar o efeito do orlistat ou da cerulenina, bem como dos fatores liberados por células neoplásicas sobre a formação de vasos sanguíneos, utilizamos o ensaio *in vitro* para formação de tubos endoteliais (Pyriochou *et al.* 2007). Os poços de uma placa de 96 poços foram revestidos com 45 μ l de Matrigel (BD, Biosciences, E.U.A.) e mantidos por 1 hora a 37 °C. Após a polimerização, 3×10^4 células HUVEC ou RAEC foram semeadas sobre a matriz e

incubadas na presença de orlistat ou cerulenina. De maneira semelhante, 3×10^4 células HUVEC foram plaqueadas e incubadas na presença de meio condicionado por 6×10^5 células SK-MEL-25 ou SCC-9 previamente tratadas com 300 μ M de orlistat. Após 16 horas, os tubos endoteliais formados foram fotografados em microscópio de contraste de fase e mensurados com auxílio de programa de computador *Image J* (Scion Corporation, E.U.A.).

4.10. Ensaio de ELISA para VEGFA

A quantidade da proteína VEGFA presente no meio condicionado pelas células B16-F10, SKMEL-25 e SCC-9 dos experimentos descritos em 4.3, 4.6 e 4.8 foi avaliado por ELISA. Os meios foram coletados, centrifugados para a remoção de debris e mantidos a -80°C até o momento da análise. A concentração da proteína VEGFA foi determinada nas células B16-F10 (Mouse VEGFA Quantikine ELISA, R & D Systems, Minneapolis, MN), SK-MEL-25 e SCC-9 (Human VEGFA DuoSet ELISA, R & D Systems) conforme as instruções do fabricante. Para a normalização dos resultados foi utilizado o número total de células.

4.11. Análise do tratamento com orlistat sobre a expressão de VEGFR-2

A expressão de VEGFR-2 na superfície das células RAEC foi estudada por citometria de fluxo com anticorpos anti-VEGFR-2 (BD, Biosciences, E.U.A.) e anti-CD31 (Dako, Dinamarca). Para isto, placas de 150 mm de diâmetro receberam 7×10^5 células da linhagem RAEC. Após o plaqueamento, as células foram tratadas com orlistat por mais 24 horas e coletadas pela raspagem com *cell-spatula* (TPP, Suíça) em PBS gelado. As células em suspensão foram então lavadas com PBS e incubadas com anticorpos primários anti-VEGFR-2 (1:25 em PBS) ou anti-CD31 (1:25 em PBS) por 1 hora a temperatura ambiente. Em sequência, as células foram novamente lavadas com PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados com FITC (Vector Laboratories, E.U.A.) por 1 hora a temperatura ambiente, diluídos a 1:100 em PBS. Depois de novamente

lavadas com PBS, a suspensão foi analisada em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson).

4.12. Análise dos efeitos de orlistat e cerulenina sobre a expressão das isoformas de VEGFA

RNA total foi purificado a partir dos *pellets* celulares usando o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Antes das reações de RT, todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1 U de DNase I (Amplification Grade, Invitrogen) por 10 minutos a temperatura ambiente. Para a síntese dos cDNAs, 4µg de RNA total foram reversamente transcrito em reações com volume final de 21µl, contendo 0,5mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNase, 50 U da enzima Superscrit II RT (Invitrogen), 0,5µg de *primers* oligo-dT (Invitrogen) e tampão 1 X (contendo 1,5mM MgCl₂). As reações foram realizadas a 42 °C por 50 minutos, seguidas de incubação a 70°C por 15 minutos. Para a amplificação específica dos cDNAs, as reações de 25 µl foram preparadas com 2µl de cDNA, 12,5 µl da solução de Master Mix Fast SYBR Green (Applied Biosystems) e 0,2mM de cada *primer*. As condições do RT-PCR quantitativo foram: 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 30 segundos e 57 °C por 1 minuto. Para normalização dos resultados, testamos individualmente os transcritos para GAPDH e β-actina, sendo ambos adequados para estas condições experimentais.

Primers específicos foram delineados a partir das sequências das respectivas isoformas de RNAs mensageiros provenientes do *GenBank* (NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - NIH, E.U.A.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para a amplificação de cada variante pró-angiogênica, foram desenhados *reverse primers* nas divisas entre os exons específicos de cada isoforma (Tabela 1): entre os exons 5 e 8 para VEGFA₁₂₁, entre 6a e 8 para VEGFA₁₄₅, entre 5 e 7 para VEGFA₁₆₅, e finalmente entre 6a e 7 para VEGFA₁₈₉. Para amplificar as isoformas anti-angiogênicas os *forward primers*

foram desenhados nas regiões entre exons 5 e 8 para VEGFA_{121b}, entre 5 e 7 para VEGFA_{165b}, entre 6a e 7 para VEGFA_{189b}, sendo os *reverse primers* colocados na região específica das isoformas anti-angiogênicas do exon 8b.

A análise da expressão gênica foi realizada através do método das curvas padrão. A expressão diferencial dos transcritos alvo foi determinada pelo método da quantificação relativa a amostras controle (amostras tratadas com etanol ou DMSO), corrigidas por um gene referência (GAPDH ou β -actina). Calculou-se a expressão gênica por equação matemática, que analisa individualmente as eficiências de amplificação de cada gene (SDS version 2.0, Applied Biosystems).

Tabela 1 - Sequência de primers para a amplificação de VEGFA murino, VEGFA humano e suas isoformas

Descrição	Sequência	Código no Genbank
VEGFA total mouse Forward	5'-TGGTGGACATCTTCCAGGAGTA-3'	NM_95200
VEGFA total mouse Reverse	5'-GCACACAGGACGGCTTGAA-3'	
GAPDH mouse Forward	5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA-3'	NM_008084.2
GAPDH mouse Reverse	5'-GCGGCACGTCAGATCCA-3'	
VEGFA total humano Forward	5'-CGAGGGCCTGGAGTGTGT-3'	NM_001025366
VEGFA total humano Reverse	5'-CGCATAATCTGCATGGTGATG-3'	
VEGFA ₁₈₉ humano Forward	5'-CGAGGAAAGGGAAAGGGGC-3'	NM_003376
VEGFA ₁₈₉ humano Reverse	5'-CCCACAGGGAACGCTCCAG-3'	
VEGFA ₁₆₅ humano Forward	5'-CCAATGCAGATTATGCGGATC-3'	NM_001025368
VEGFA ₁₆₅ humano Reverse	5'-CAAGGCCACAGGGATTTTC-3'	
VEGFA ₁₂₁ humano Forward	5'-ATGCAGATTATGCGGATCAAACC-3'	NM_001025370
VEGFA ₁₂₁ humano Reverse	5'-CGGCTTGTCACATTTTTCTTGTC-3'	
VEGFA _{165b} humano Forward	5'-CAAGAAAATCCCTGTGGGCC-3'	NM_001033756
VEGFA _{165b} humano Reverse	5'-TGAGAGATCTGCAAGTACGTTTCG-3'	
GAPDH humano Forward	5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3'	NM_002046.3
GAPDH humano Reverse	5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'	

4.13. Forma de análise dos resultados

Após obtenção dos valores médios de cada período de contagem dos ensaios de proliferação, foram construídos gráficos utilizando-se o programa Excel (Microsoft, E.U.A.). 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 SigmaStat (Jandel Scientific Software, EUA). O nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos do tratamento com orlistat ou cerulenina sobre as células RAEC e HUVEC

5.1.1 Orlistat ou cerulenina provocam perda de viabilidade e induzem apoptose em células RAEC

Em nossa dissertação de mestrado, verificamos que o tratamento com cerulenina ou com orlistat reduzem significativamente a proliferação das células RAEC. Com a finalidade de compreender a melhor este fenômeno, realizamos aqui ensaios de viabilidade celular a fim de determinarmos a concentração ideal de cada uma das drogas para experimentos de apoptose e ciclo celular.

Como ilustrado na Figura 1, nos ensaios de MTT houve redução dose-dependente da viabilidade das células RAEC quando tratadas com cerulenina ou orlistat por um período de 24 horas. O efeito do orlistat ou da cerulenina sobre a distribuição das células RAEC em cada fase do ciclo celular foi avaliado através de experimentos de citometria de fluxo. Observamos um aumento gradual das populações celulares em G0-G1 concomitante a um declínio do número de células na fase S nos grupos tratados com ambas as drogas (Figura 2). O efeito foi mais acentuado nos períodos de 72 horas com cerulenina e 96 horas com orlistat. Com relação às taxas de morte celular por apoptose, aumento significativo foi observado nas células RAEC tratadas com 100 μ M de orlistat ou 0,75 μ g/ml de cerulenina, pelos período de 24 horas (Figura 3).

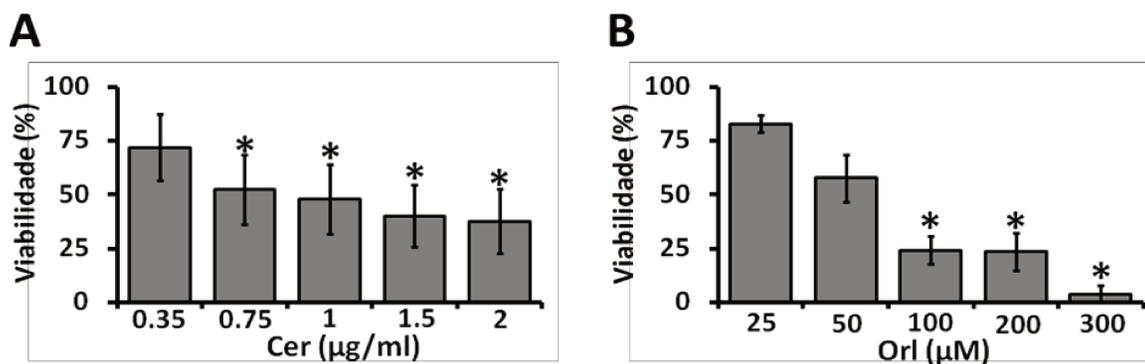


Figura 1- Análise da porcentagem de células RAEC viáveis após o tratamento com cerulenina (Cer) ou orlistat (Orl) por 24 horas. A redução significativa das taxas de viabilidade foi observada nas células tratadas com 0,75, 1, 1,5 e 2 µg/ml de cerulenina (**A**) ou 100, 200 e 300 µM de orlistat (**B**) (* $p < 0,05$, orlistat x etanol, cerulenina x DMSO, teste t de Student). Cada gráfico representa a média de 3 experimentos independentes.

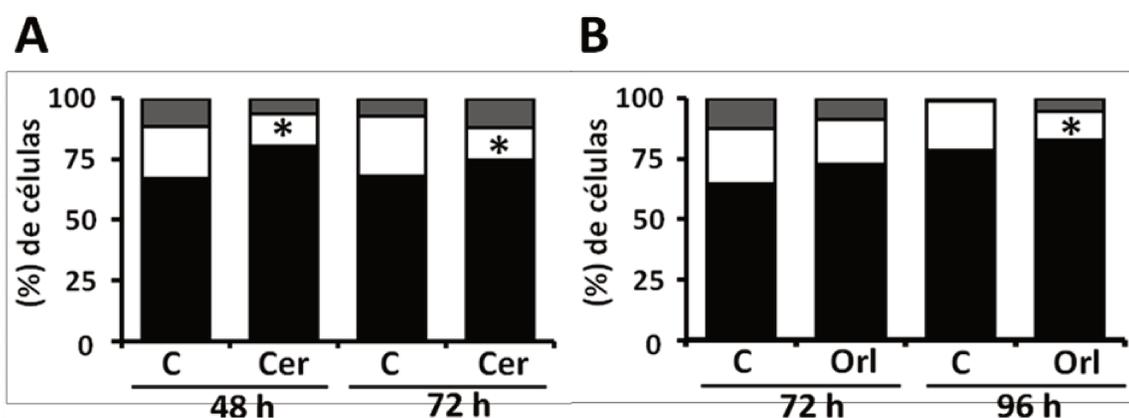


Figura 2- Distribuição das células RAEC nas fases do ciclo celular após tratamento com 0,75 µg/ml de cerulenina (**A**) ou com 100 µM de orlistat (**B**). (**A**) Podemos observar um gradativo aumento do número de células nas fases G0/G1 (■) concomitante com uma diminuição da fase S (□) em 48 horas, além de discreto aumento de G2/M (▒) em 72 horas. (**B**) Houve um gradativo aumento do número de células nas fases G0/G1 (■) concomitante com uma diminuição da fase S (□) em 72 e 96 horas (* $p < 0,05$; teste t de Student). Cada gráfico representa a média de 3 experimentos independentes.

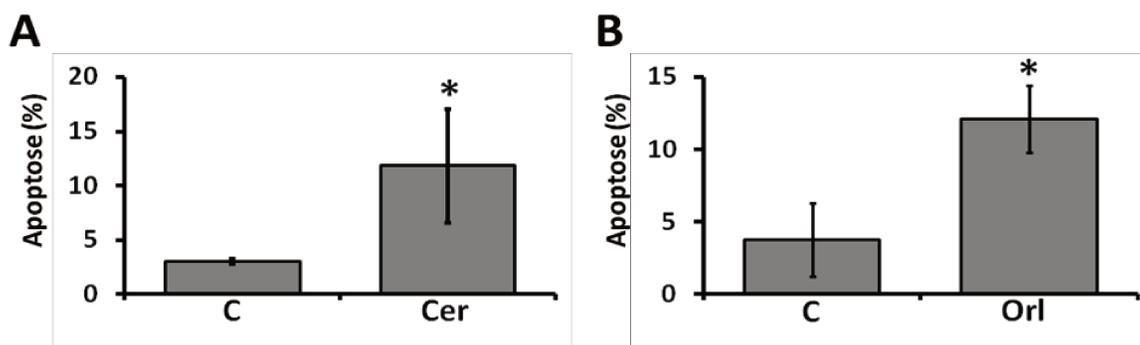


Figura 3- Porcentagem de células RAEC positivas para anexina V por citometria de fluxo, após tratamento com 0,75 µg/ml de cerulenina (**A**) ou com 100 µM orlistat (**B**) por 24 horas. Aumento significativo das taxas de apoptose foi observado nas células tratadas com as duas drogas, quando comparadas, aos seus respectivos controles DMSO e etanol (C) (* $p < 0,005$, teste t de Student). Cada gráfico representa a média de 3 experimentos independentes.

5.1.2 Efeitos do orlistat e da cerulenina na formação de túbulos endoteliais pelas células RAEC

Como demonstrado nos resultados anteriores, o tratamento com inibidores de FASN é capaz de reduzir a viabilidade e induzir a apoptose nas células RAEC. Prosseguimos verificando se o tratamento com orlistat ou cerulenina seria capaz de alterar as estruturas vasculares formadas por estas células em matrigel. Como observado nas Figuras 4 e 5, as duas drogas foram capazes de reduzir a formação de túbulos endoteliais pelas células RAEC.

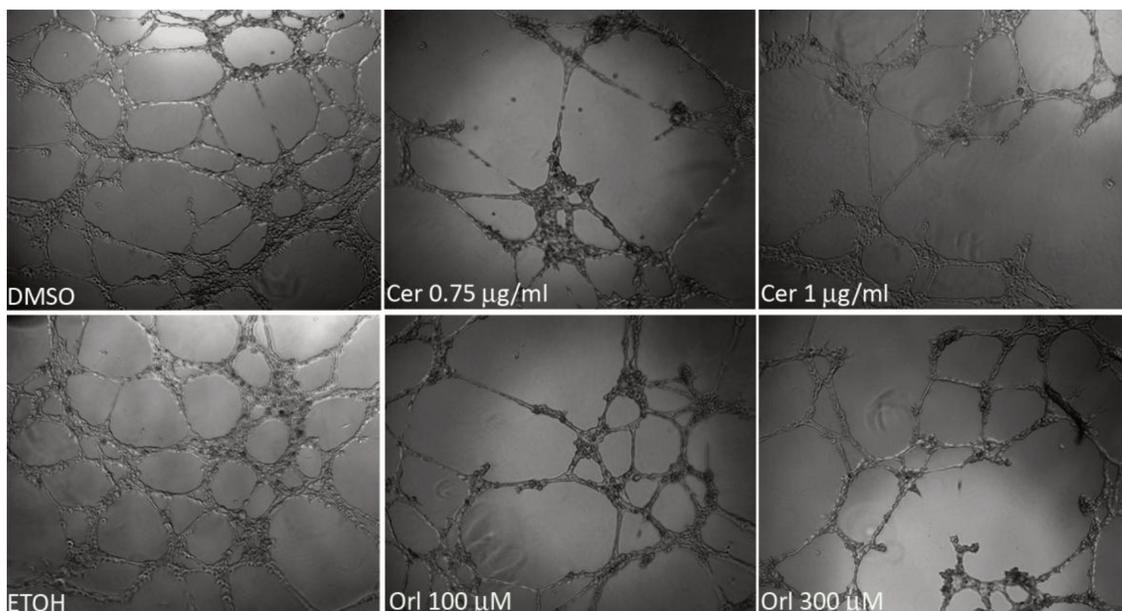


Figura 4- Imagens representativas dos ensaios de formação de túbulos pelas células RAEC tratadas com os 0,75 µg/ml e 1 µg/ml de cerulenina ou com 100 µM e 300 µM de orlistat por 16 horas, em relação aos controles DMSO e etanol. (Aumento original de 40 X).

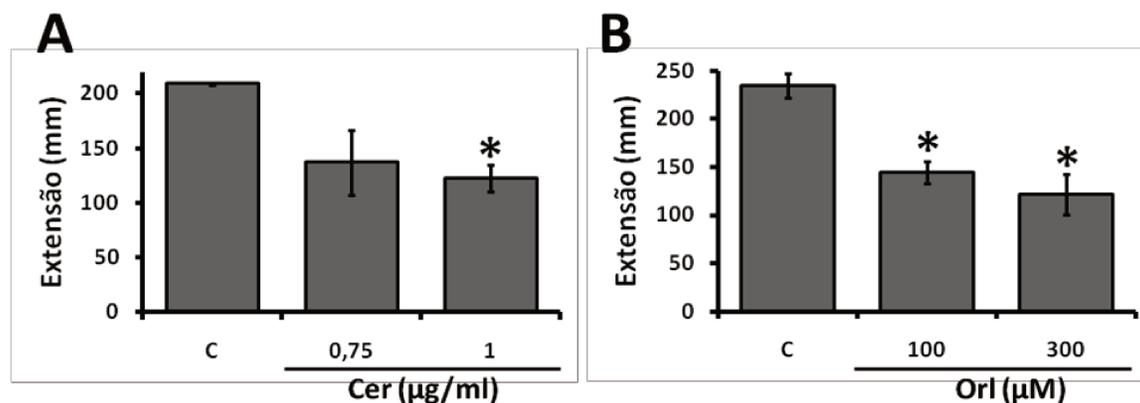


Figura 5- Extensão dos túbulos formados pelas células RAEC, após tratamento com 0,75 µg/ml e 1 µg/ml de cerulenina (A) ou com 100 µM e 300 µM orlistat (B) por 16 horas. Redução significativa do comprimento foi observado nas células tratadas tanto com 1µg/ml de cerulenina (Cer) quanto com 100 e 300 µM de orlistat (Orl), quando comparados aos seus respectivos controles DMSO e etanol (C) (* $p < 0,05$, teste t de Student). Cada gráfico representa a média obtida de 2 experimentos independentes.

5.1.3 Orlistat ou cerulenina não alteram a viabilidade das células endoteliais HUVEC

Com o objetivo de compreender melhor os efeitos dos inibidores de FASN sobre as células endoteliais de vasos sanguíneos, utilizamos culturas primárias de células HUVEC em ensaios de viabilidade celular, visando a determinação da concentração ideal de cada droga para os experimentos de formação dos vasos *in vitro*. Como ilustrado na Figura 6, nos ensaios de MTT não houve redução da viabilidade das células HUVEC quando tratadas com cerulenina ou orlistat por um período de 48 horas em meio RPMI contendo 10% de SFB. As células controle foram tratadas com etanol ou DMSO no mesmo volume equivalente à maior concentração utilizada de cada droga.

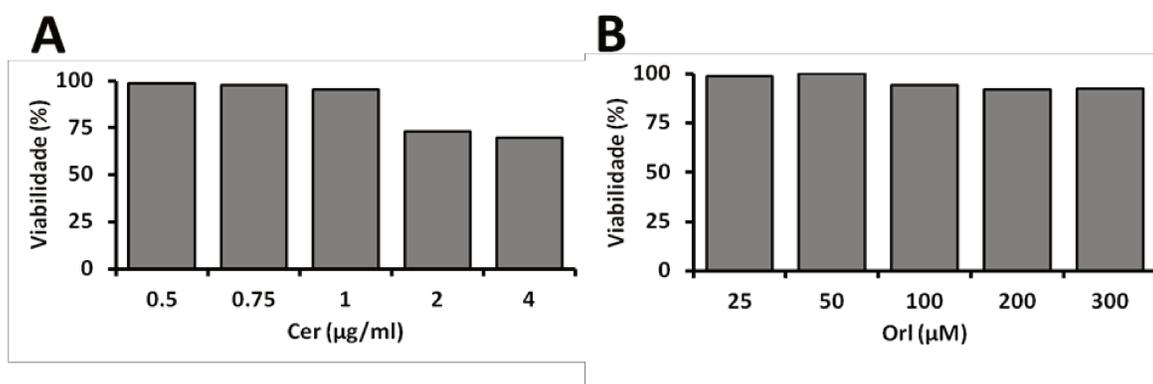


Figura 6- Porcentagem de células HUVEC viáveis após o tratamento com cerulenina (Cer) ou orlistat (Ori) por 48 horas em meio RPMI com 10% de SFB. Observamos que não houve redução significativa das taxas de viabilidade nas células tratadas com diferentes concentrações de ambas as drogas (**A e B**). Os gráficos representam um de três experimentos independentes realizados.

5.1.4. Efeitos do orlistat e da cerulenina na formação de túbulos endoteliais pelas células HUVEC

Como verificado nos experimentos mostrados em 5.1.3, o tratamento com inibidores de FASN não é capaz de reduzir a viabilidade nas células HUVEC. De acordo com este achado, orlistat também não foi capaz de inibir as células HUVEC no processo de formação de estruturas vasculares em matrigel (Figuras 7 e 8).

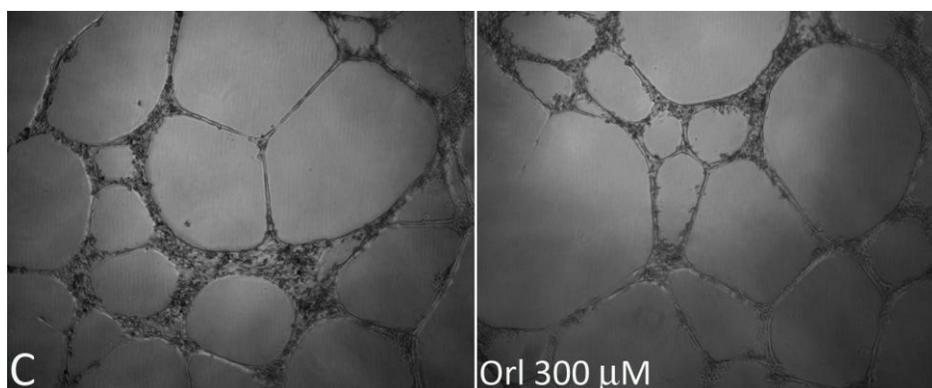


Figura 7- Imagens representativas dos ensaios de formação de túbulos vasculares pelas células HUVEC tratadas com 300 μM de orlistat ou com etanol somente (C). (Aumento original de 40 X).

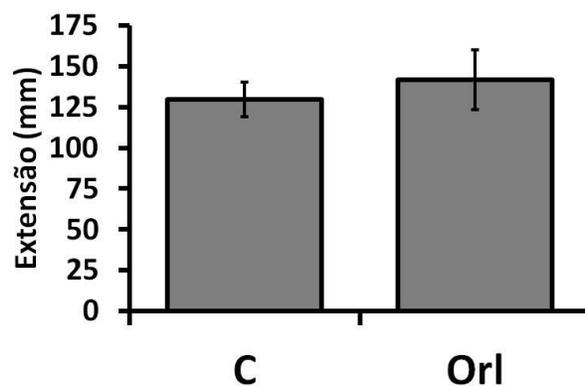


Figura 8- Após a análise, em programa de computador, observamos que não houve diferença significativa na extensão das estruturas tubulares formadas pelas células HUVEC após tratamento com 300 μM de orlistat por 16 horas. ($p=0,2856$, teste t de Student). Cada gráfico representa a média de 3 experimentos independentes.

5.2. O meio de cultura condicionado por células neoplásicas aumenta a proliferação das células endoteliais derivadas de vasos sanguíneos

Proteínas produzidas e secretadas pelas células B16-F10 de camundongo aumentam a proliferação das células endoteliais RAEC, assim como as produzidas pelas células SK-MEL-25 e SCC-9 estimulam a proliferação das células endoteliais HUVEC. A Figura 9 mostra este efeito nas células RAEC, em 48 horas, e as Figuras 10 e 11 nas células HUVEC, após 24 e 48 horas. Em todos os experimentos, o crescimento celular foi mais acentuado no período de 48 horas.

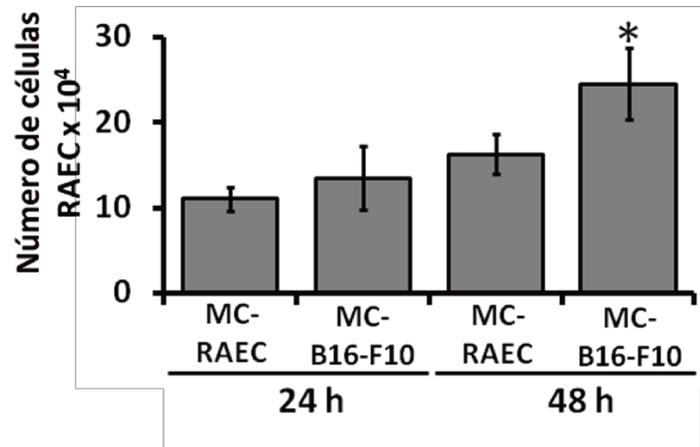


Figura 9- Efeito da incubação com meio condicionado por células B16-F10 (MC-B16F10) sobre a proliferação das células RAEC, nos períodos de 24 e 48 horas, em comparação aos controles tratados com meio metabolizado pelas próprias células RAEC (MC-RAEC). Para a contagem do número de células utilizou-se uma câmara Neubauer em microscópio de contraste de fase (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

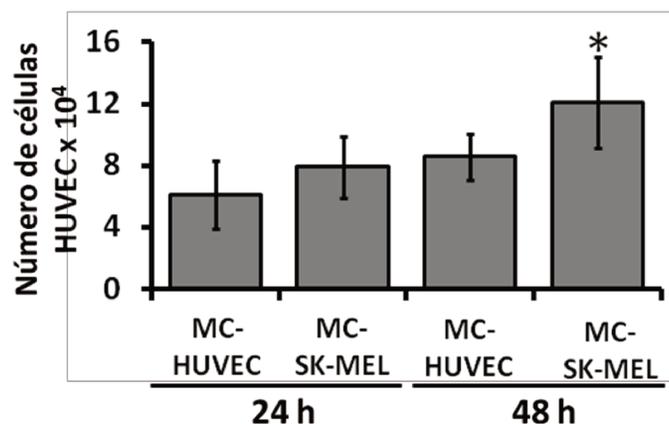


Figura 10- Análise do efeito da incubação com meio condicionado por células de SK-MEL-25 sobre a proliferação das células HUVEC (MC-SK-MEL-25) nos períodos de 24 e 48 horas, em comparação aos controles tratados com meio metabolizado pelas próprias células HUVEC (MC-HUVEC). Para a contagem do número de células utilizou-se uma câmara Neubauer em microscópio de contraste de fase (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

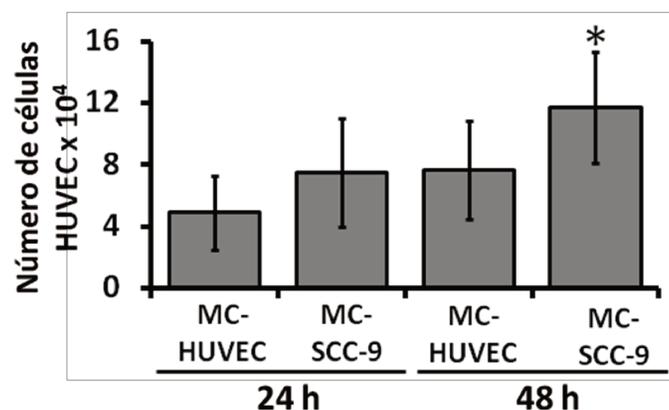


Figura 11- Efeito da incubação com meio condicionado por células SCC-9 (MC-SCC-9) sobre a proliferação das células HUVEC nos períodos de 24 e 48 horas, em comparação aos controles tratados com meio metabolizado pelas próprias células HUVEC (MC-HUVEC). Para a contagem do número de células utilizou-se uma câmara Neubauer em microscópio de contraste de fase (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

Para verificar se o VEGFA liberado pelas células B16-F10 era o responsável pelo aumento da proliferação das células RAEC (Figura 9), os seus níveis protéicos foram mensurados através de ensaios de ELISA. De fato, a

concentração de VEGFA é mais alta no meio de cultura das células B16-F10, quando comparadas ao meio das células RAEC (Figura 12).

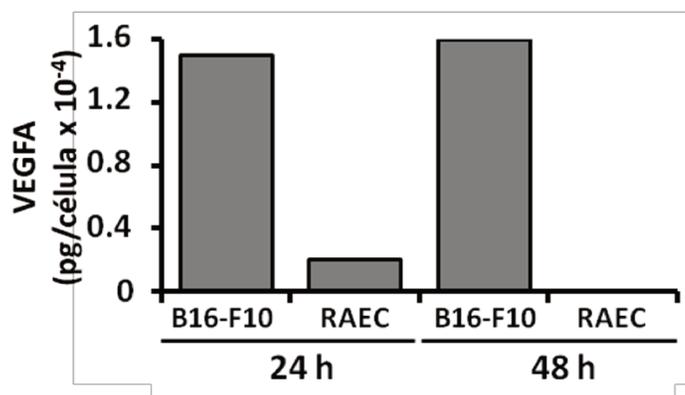


Figura 12- Análise da quantidade de VEGFA liberado pelas células B16-F10 e RAEC, em condições normais de cultivo, nos períodos de 24 e 48 horas. Verificamos que as células B16-F10 produzem quantidade expressivamente maior de VEGFA, quando comparado as células RAEC. Observe que não há diferenças entre os níveis protéicos de VEGFA de 24 para 48 horas.

No intuito de entender os efeitos dos inibidores de FASN sobre a produção de VEGFA pelas células B16-F10, SK-MEL-25 e SCC-9, analisamos também as concentrações de VEGFA no meio destas células sob os efeitos do orlistat. Verificamos nos experimentos mostrados nas Figuras 13, 14 e 15 que houve um aumento expressivo da quantidade de VEGFA secretado no meio de cultura. Para confirmar que o estímulo na produção de VEGFA após o tratamento com orlistat é causado pela inibição de FASN, a produção desta enzima foi reduzida através de siRNA. As Figuras 16 B, 17 B e 18 B mostram reações de western blot referentes aos experimentos mostrados nas Figuras 16 A, 17 A e 18 A, nos quais 200 nM de siRNAs específicos para FASN foram utilizados. Após 48 horas da transfecção das células B16-F10 e 36 horas da transfecção das células SK-MEL-25 e SCC-9, a quantidade da proteína FASN foi diminuída, o que provocou aumento na secreção de VEGFA. Portanto, siRNAs específicos para FASN recapitulam os efeitos do aumento da produção de VEGFA após o tratamento com orlistat.

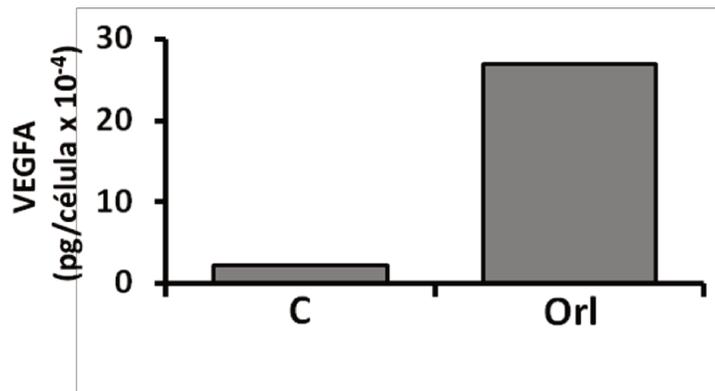


Figura 13- A concentração de VEGFA no meio de cultura de células B16-F10 aumenta após o tratamento com 300 μ M orlistat (Orl) por 48 horas, em comparação ao veículo etanol (C). O gráfico representa um de três experimentos independentes.

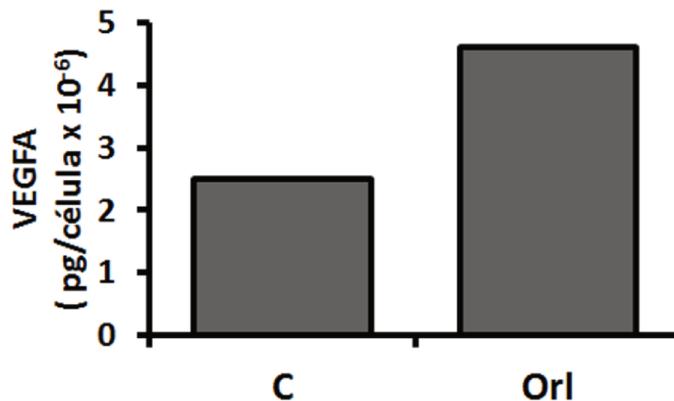


Figura 14- A concentração de VEGFA no meio de cultura de células SK-MEL-25 aumenta após o tratamento com 300 μ M orlistat (Orl) por 36 horas, em comparação ao veículo etanol (C). O gráfico representa um de três experimentos independentes.

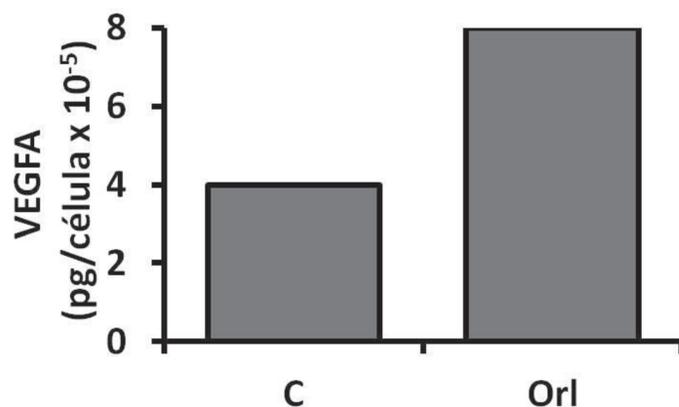


Figura 15- A concentração de VEGFA no meio de cultura de células SCC-9 aumenta após o tratamento com 300 μ M orlistat (Orl) por 36 horas, em comparação ao veículo etanol (C). O gráfico representa um de três experimentos independentes.

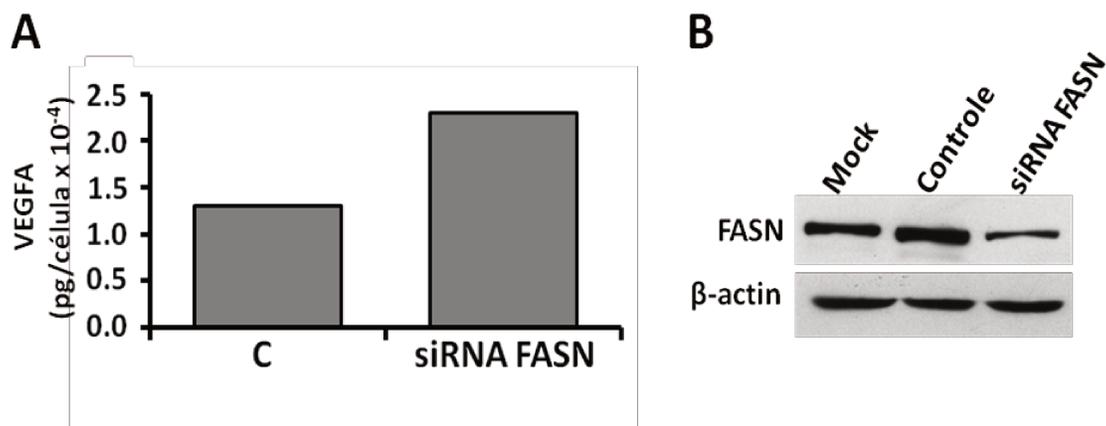


Figura 16- (A) Aumento da quantidade de VEGFA no meio de cultura de células B16-F10 após o *knockdown* de FASN com siRNAs específicos. (B) Reações de western blot mostrando a redução da quantidade de FASN em células B16-F10 tratadas com siRNA (200 nM) para FASN por 48 horas. Anticorpos anti- β -actina foram utilizados como controle da quantidade de proteína aplicada em cada canaleta. O gráfico representa um de três experimentos independentes. Mock (controle de transfecção).

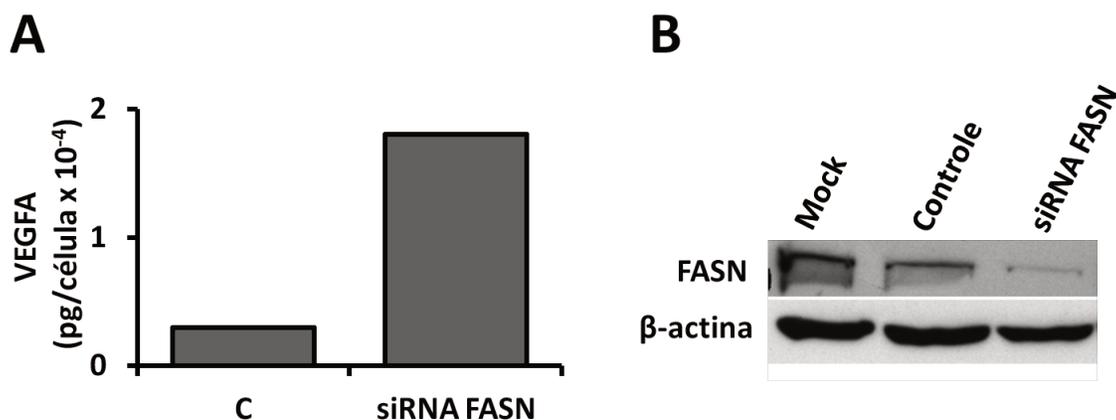


Figura 17- (A) Aumento da quantidade de VEGFA no meio de cultura de células SK-MEL-25 após o *knockdown* de FASN com siRNAs específicos. (B) Reações de western blot mostrando a redução da quantidade de FASN em células B16-F10 tratadas com siRNA (200 nM) para FASN por 48 horas. Anticorpos anti-β-actina foram utilizados como controle da quantidade de proteína aplicada em cada canaleta. O gráfico representa um de três experimentos independentes. Mock (controle de transfecção).

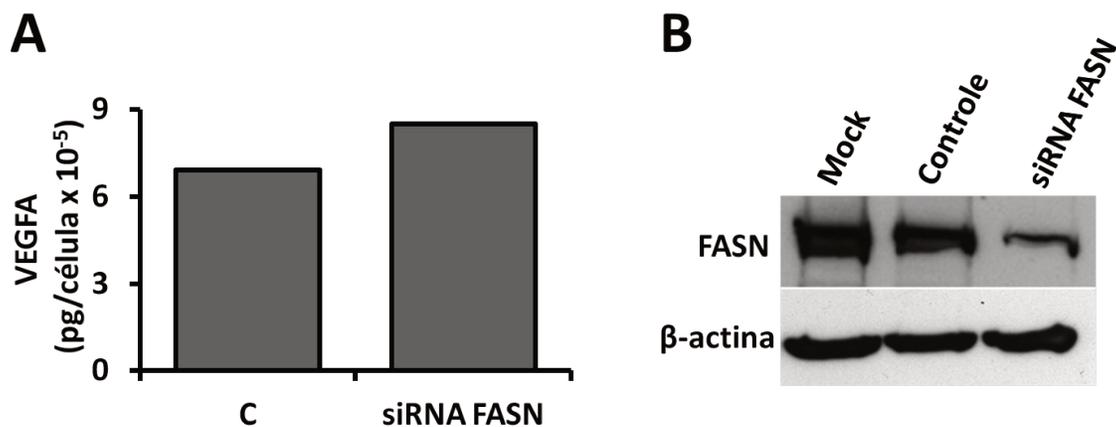


Figura 18- (A) Pequeno aumento da quantidade de VEGFA no meio de cultura de células SCC-9 após o *knockdown* de FASN com siRNAs específicos. (B) Reações de western blot mostrando a redução da quantidade de FASN em células B16-F10 tratadas com siRNA (200 nM) para FASN por 48 horas. Anticorpos anti-β-actina foram utilizados como controle da quantidade de proteína aplicada em cada canaleta. O gráfico representa um de três experimentos independentes. Mock (controle de transfecção).

5.3. Efeitos dos meios de cultura condicionados por células neoplásicas tratadas com orlistat sobre a proliferação das células endoteliais derivadas dos vasos sanguíneos

Tendo-se em vista que tratamento com orlistat aumenta a produção de VEGFA e que nossos resultados da dissertação de mestrado mostraram, além de redução dos vasos sanguíneos peritumorais nos camundongos tratados com orlistat, aumento da expressão de VEGFA nos mesmos melanomas experimentais, buscamos entender os efeitos desta droga sobre as isoformas de VEGFA. Para isto, utilizamos o meio condicionado por células B16-F10 tratadas com orlistat por 48 horas, no qual incubamos as células RAEC. Da mesma forma, células SK-MEL-25 e SCC-9 forneceram meios de cultura para incubar células HUVEC. Na Figura 19 verificamos que, apesar de haver redução significativa no número de células RAEC incubadas com meio controle, não houve aumento do número de células RAEC nos períodos de 24 para 48 horas. Por outro lado, as Figuras 20 e 21 mostram que o número de células HUVEC foi significativamente reduzido após exposição ao meio condicionado por células SK-MEL-25 ou SCC-9 tratadas com orlistat.

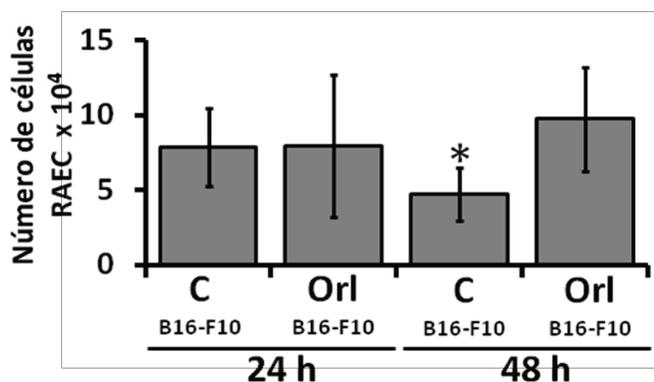


Figura 19- Efeito da incubação com meio condicionado por células B16-F10 tratadas com 300 μ M de orlistat (Orl B16-F10) sobre a proliferação das células RAEC nos períodos de 24 e 48 horas, em comparação aos controles (C B16-F10), tratados com meio metabolizado pelas células B16-F10 com o veículo etanol. Para a contagem do número de células utilizou-se uma câmara Neubauer em microscópio de contraste de fase (* $p < 0,05$; *test t* de Student). O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

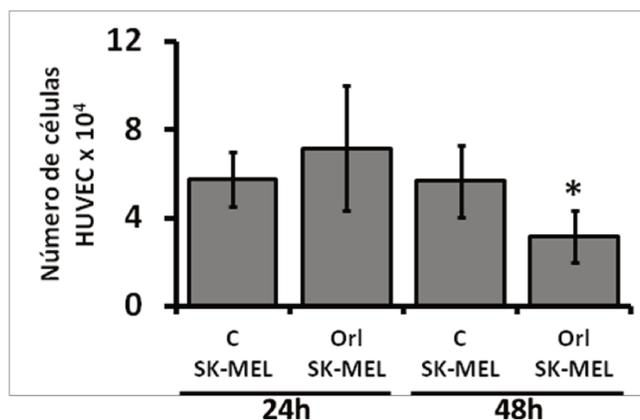


Figura 20- Efeito da incubação com meio condicionado por células SK-MEL-25 tratadas com 300 μ M de orlistat (Orl SK-MEL-25) sobre a proliferação das células HUVEC nos períodos de 24 e 48 horas, em comparação aos controles (C SK-MEL-25), tratados com meio metabolizado pelas células SK-MEL-25 contendo o veículo etanol. Para a contagem do número de células utilizou-se uma câmara Neubauer em microscópio de contraste de fase (* $p < 0,05$; *test t* de Student). O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

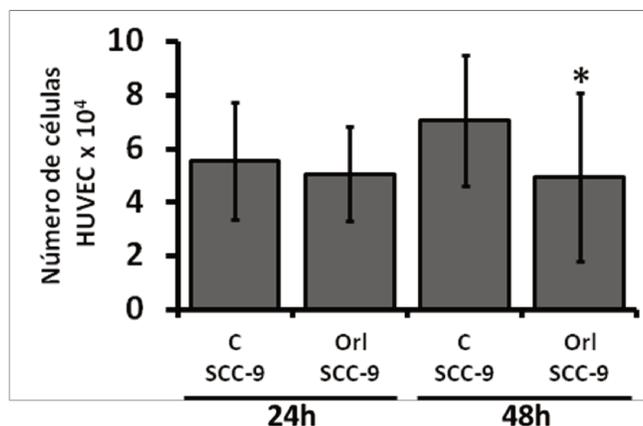


Figura 21- Efeito da incubação com meio condicionado por células SCC-9 tratadas com 300 μ M de orlistat (Orl SCC-9) sobre a proliferação das células HUVEC nos períodos de 24 e 48 horas, em comparação aos controles (C SCC-9), tratados com meio metabolizado pelas células SCC-9 contendo o veículo etanol. Para a contagem do número de células utilizou-se uma câmara Neubauer em microscópio de contraste de fase (* $p < 0,05$; *test t* de Student). O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

5.4. Efeitos dos meios de cultura condicionados por células neoplásicas tratadas com orlistat sobre a formação de estruturas semelhantes a vasos pelas células HUVEC

Considerando que os meios condicionados pelas células neoplásicas tratadas com orlistat reduzem significativamente a proliferação das células endoteliais HUVEC, buscamos compreender se efeito semelhante ocorreria na formação de estruturas semelhantes a vasos. Para isto, utilizamos os meios condicionados sobre as células HUVEC em matrigel. Nas Figuras 22 e 23, verificamos que houve redução significativa da extensão de vasos formados pelas células HUVEC incubadas com meio condicionado pelas células tratadas com orlistat, sugerindo que estas células, sob efeito da droga, secretam fatores que inibem a angiogênese.

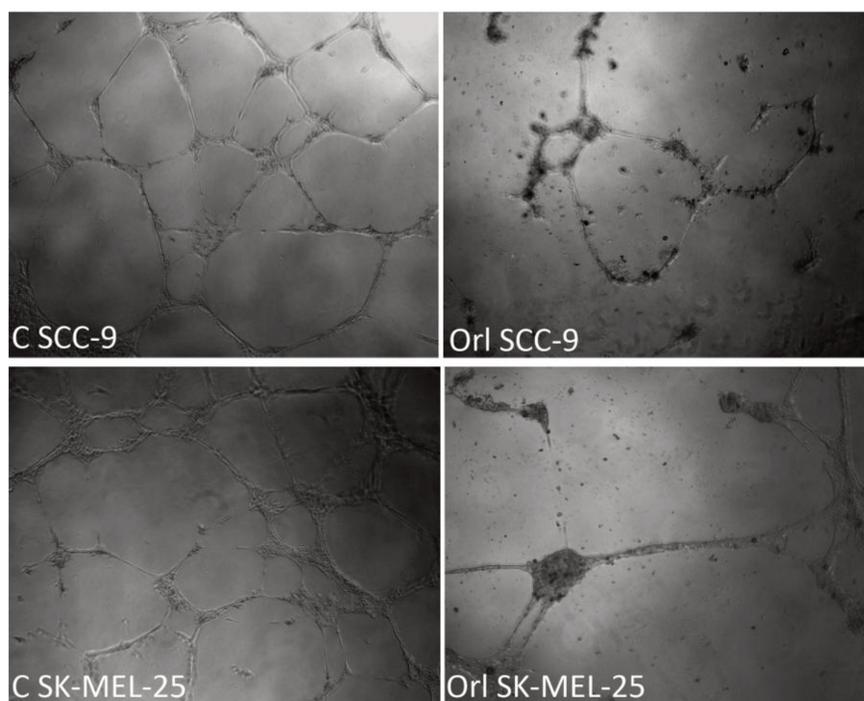


Figura 22- Imagens representativas dos ensaios de formação de túbulos pelas células HUVEC incubadas com meios condicionados pelas células SCC-9 e SK-MEL-25 tratadas com 300 μ M de orlistat (Orl SCC-9 e Orl SK-MEL-25). Os controles receberam o meio de cultura condicionado pelas células SCC-9 e SK-MEL-25 tratadas com etanol (C SCC-9 e C SK-MEL-25) (Aumento original de 40 X).

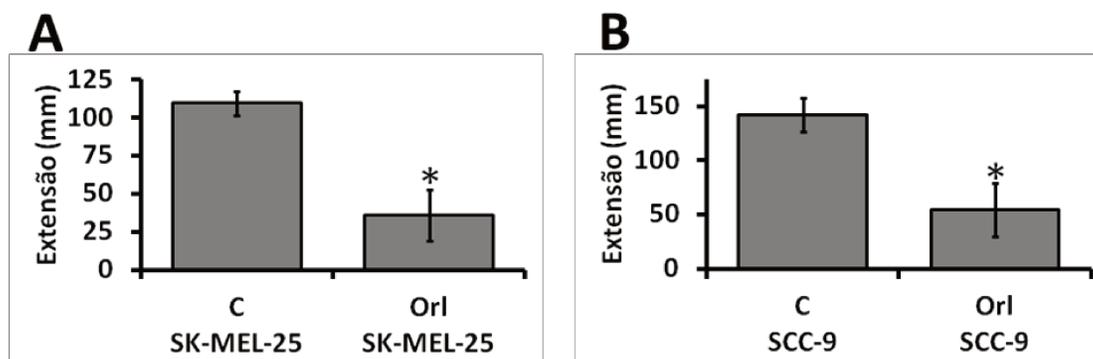


Figura 23- Redução significativa do comprimento dos vasos formados pelas células HUVEC incubadas tanto com o meio condicionado pelas células SK-MEL-25 (**A**) quanto com o meio condicionado pelas células SCC-9 (**B**) tratadas com orlistat, quando comparados aos seus respectivos controles (* $p < 0,05$, teste t de Student). Cada gráfico representa a média de 2 experimentos independentes.

5.5. Efeitos da cerulenina e do orlistat sobre a expressão de RNAs mensageiros de VEGFA

Prosseguimos investigando agora a produção de RNAs mensageiros para VEGFA total nas células B16-F10, SK-MEL-25 e SCC-9 tratadas com cerulenina ou orlistat, bem como das isoformas pró-angiogênicas VEGFA₁₈₉, VEGFA₁₆₅ e VEGFA₁₂₁ e anti-angiogênicas VEGFA_{189b}, VEGFA_{165b} e VEGFA_{121b}. As isoformas de VEGFA foram estudadas somente nas linhagens humanas, pois somente estas sequências estão detalhadas no GenBank.

De uma forma geral, verificamos nas Figuras 24 a 30 que a produção de RNAs mensageiros para VEGFA total e suas variantes foi aumentada pelo tratamento com orlistat, principalmente na concentração de 300 µM. Em concentrações diferentes, e nem sempre de maneira dose-dependente, cerulenina também aumentou a expressão relativa de RNAs mensageiros para VEGFA e suas isoformas. VEGFA_{189b} e VEGFA_{121b} foram testados nas células SK-MEL-25 e SCC-9, entretanto, apesar de elevada quantidade de RNA utilizada, não foi possível a amplificação de seus respectivos mensageiros (dados não mostrados). A Figura 24 A foi mostra que a expressão de RNAs mensageiros para VEGFA total foi aumentada de maneira dose-dependente nas células B16-F10 após o tratamento com orlistat, já o tratamento com cerulenina promoveu aumento significativo nas três concentrações testadas (Figura 24 B).

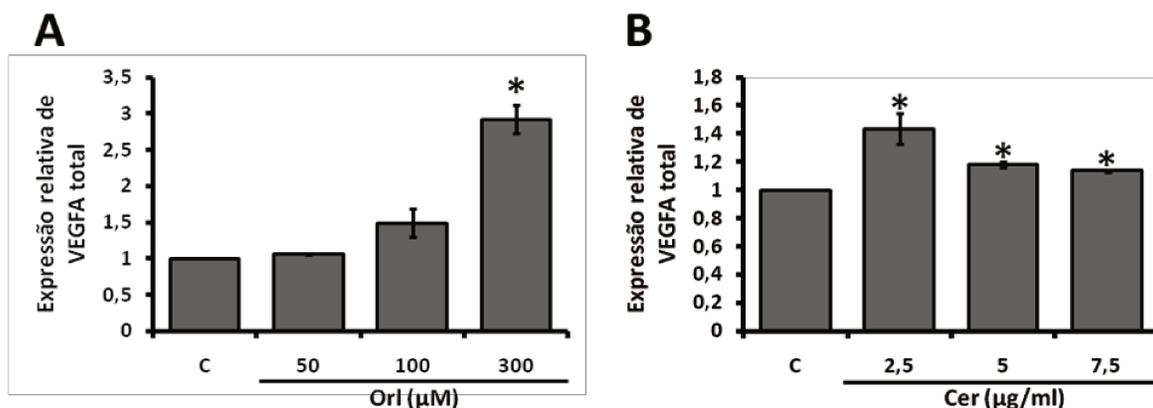


Figura 24– Análise por RT-PCR quantitativo para verificação dos níveis de RNAs mensageiros para VEGFA total, após o tratamento das células B16-F10 com diferentes concentrações de orlistat (Ori) ou de cerulenina (Cer). Nota-se maior expressão dos RNAs mensageiros para VEGFA total quando as células B16-F10 foram tratadas com 300 µM de orlistat (**A**). O tratamento com 2,5, 5 e 7,5 µg/ml de cerulenina aumentaram significativamente a expressão de RNAs mensageiros para VEGFA total nas células B16-F10 (**B**). (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

Nas células SK-MEL-25 o mesmo padrão de expressão relativa de RNAs mensageiros foi observado após o tratamento com orlistat (Figuras 25 A, 26 A, 26 C e 26 E), um aumento significativo de VEGFA total e das isoformas pró-angiogênicas VEGFA₁₈₉, VEGFA₁₆₅ e VEGFA₁₂₁ na concentração de 300 µM. RNAs mensageiros para a isoforma anti-angiogênica VEGFA_{165b} foram progressivamente aumentados, paralelamente ao aumento da concentração de orlistat (Figura 27 A). O tratamento com cerulenina nas células SK-MEL-25 aumentou a produção de RNAs mensageiros para VEGFA total, principalmente na concentração de 1,2 µg/ml (Figura 25 B). Nesta mesma concentração, a produção de RNAs mensageiros para a isoforma VEGFA₁₂₁ (Figura 26 F) e VEGFA_{165b} (Figura 27 B) foi também aumentada. Entretanto, as quantidades relativas de RNAs mensageiros para as isoformas VEGFA₁₈₉ e VEGFA₁₆₅ aumentaram significativamente na concentração de 2,5 µg/ml de cerulenina (Figuras 26 B e 26 D).

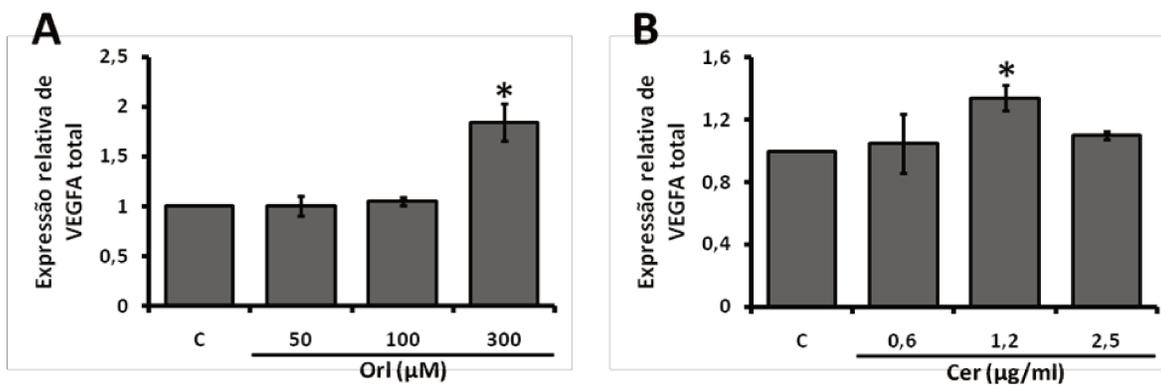


Figura 25– Níveis de RNAs mensageiros para VEGFA total após o tratamento das células SK-MEL-25 com diferentes concentrações de orlistat ou cerulenina. Observamos maior expressão dos RNAs mensageiros para VEGFA total quando as células SK-MEL-25 foram expostas à 300 μM de orlistat (**A**). O tratamento com 1,2 μg/ml de cerulenina foi capaz de aumentar significativamente a expressão de RNAs mensageiro para VEGFA total nas células SK-MEL-25 (**B**). (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

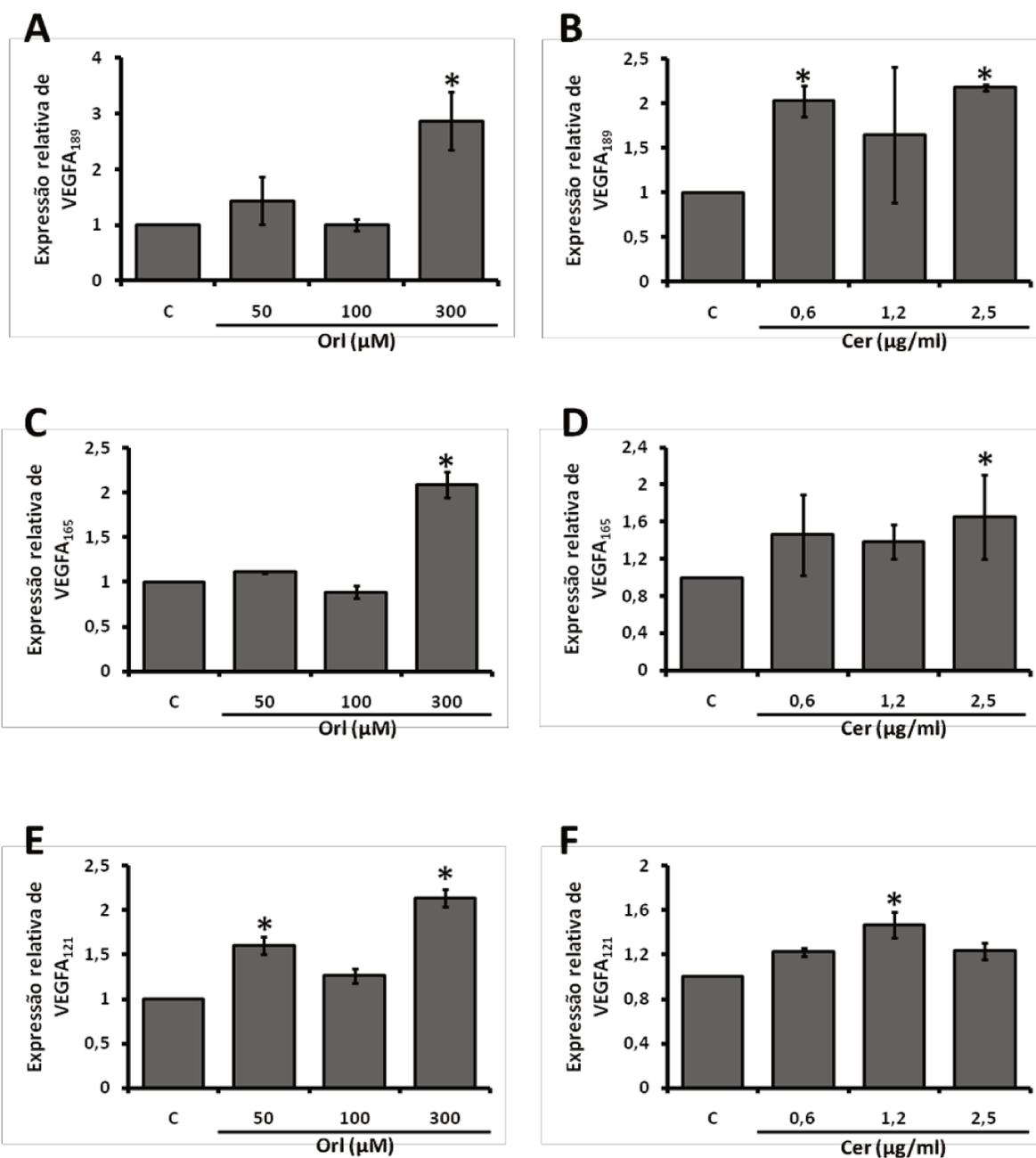


Figura 26– Expressão relativa de RNAs mensageiros para cada isoforma pró-angiogênica de VEGFA nas células SK-MEL-25, em relação aos controles (C), após o tratamento com orlistat (Ori) ou cerulenina (Cer). Em **A** e **B** verificamos aumento significativo da expressão dos RNAs mensageiros para VEGFA₁₈₉ com 300 μM de orlistat ou com 0,6 e 2,5 μg/ml de cerulenina. Nas maiores concentrações das drogas, 300 μM de orlistat (**C**) e 2,5 μg/ml de cerulenina (**D**), observamos aumento significativo da expressão de RNAs mensageiros para VEGFA₁₆₅. Com relação ao VEGFA₁₂₁ (**E** e **F**), apesar do aumento observado em todas as concentrações de orlistat e cerulenina, foram 50 e 300 μM de orlistat (**E**) e 1,2 μg/ml de cerulenina capazes de aumentar

significativamente a expressão de RNAs mensageiros para esta isoforma. (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

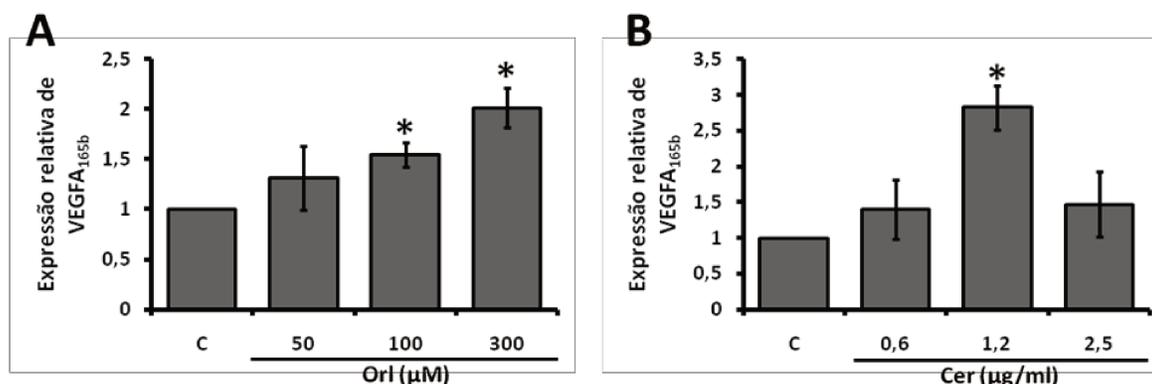


Figura 27– Análise quantitativa dos níveis de RNAs mensageiros para a isoforma anti-angiogênica VEGFA_{165b} após o tratamento das células SK-MEL-25 com diferentes concentrações de orlistat (Ori) ou cerulenina (Cer). Em **(A)** observamos aumento dose-dependente da expressão de VEGFA_{165b} com 50, 100 e 300 µM de orlistat, em relação ao controle etanol (C). Em **(B)**, verificamos que 1,2 µg/ml de cerulenina foi capaz de aumentar significativamente a expressão de RNAs mensageiros para VEGFA_{165b}, em relação ao controle DMSO (C). (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

Assim como nas células SK-MEL-25, as células SCC-9 mostraram aumento da quantidade relativa de RNAs mensageiros para VEGFA total com 300 µM de orlistat ou 5 µg/ml de cerulenina (Figura 28). De uma maneira geral, nestas células, houve aumento da expressão relativa de RNAs mensageiros para as isoformas VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₆₅ e VEGFA₁₈₉ (Figura 29 A, C e E). Da mesma forma, o tratamento com cerulenina também aumentou significativamente a produção de RNAs mensageiros para todas as isoformas pró-angiogênicas de VEGFA estudadas (Figuras 29 B, 29 D e 29 F). Nas mesmas concentrações, o tratamento com orlistat ou cerulenina promoveu aumento na expressão de RNAs mensageiros para a variante anti-angiogênica VEGFA_{165b} nas células SCC-9 (Figura 30).

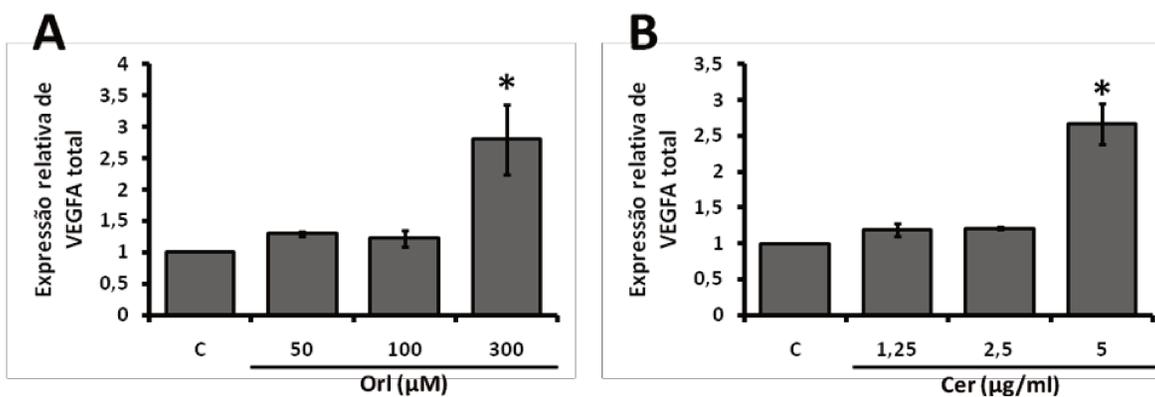


Figura 28– A expressão relativa de RNAs mensageiros para VEGFA total após o tratamento das células SCC-9 com orlistat (Orl) ou cerulenina (Cer). Observamos que com 300 μM de orlistat (**A**) ou com 5 μg/ml de cerulenina (**B**) houve aumento significativo de RNAs mensageiro para VEGFA total, em relação aos seus respectivos controles (C). (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

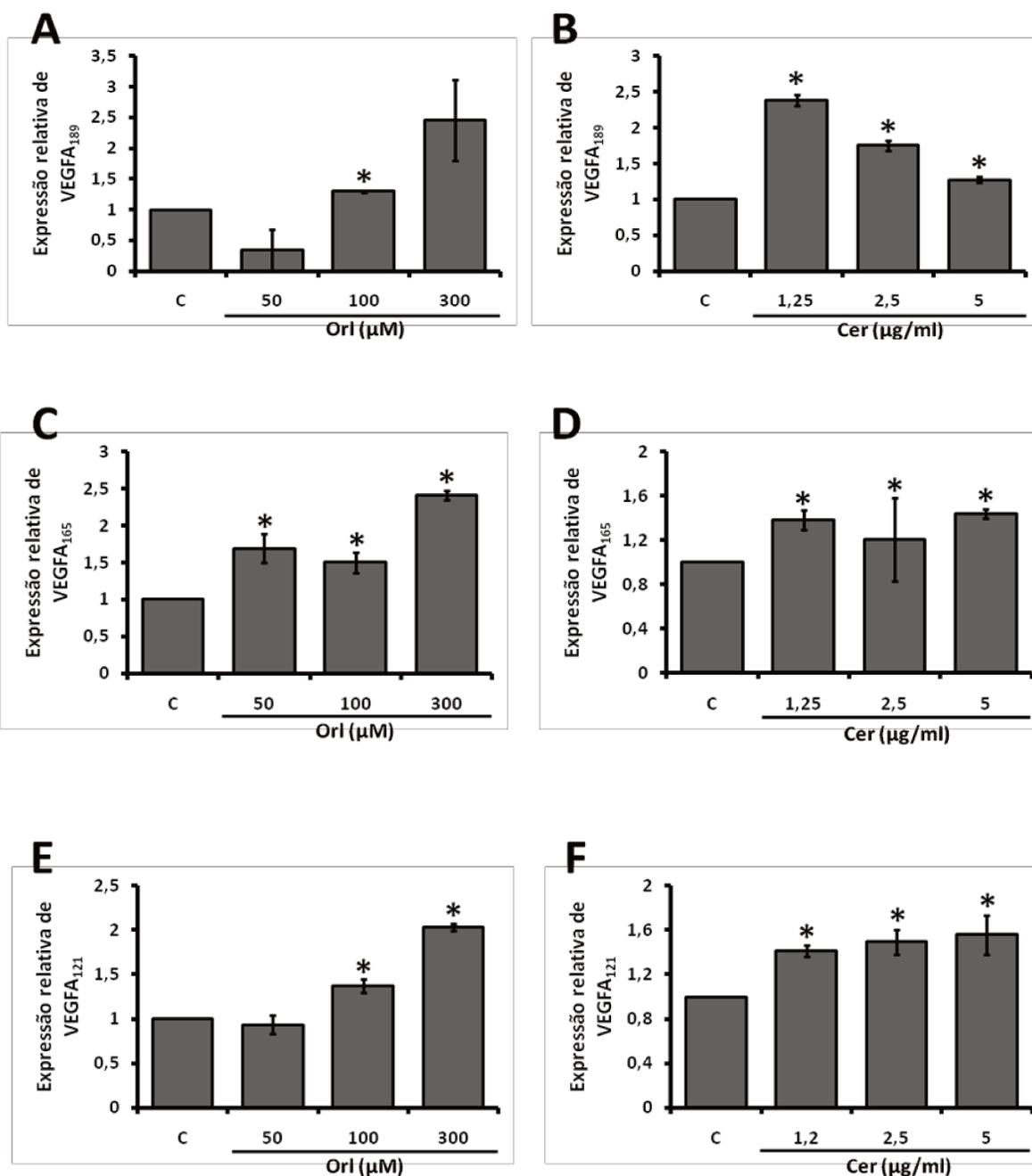


Figura 29- Expressão relativa de RNAs mensageiros para as isoformas pró-angiogênicas de VEGFA, VEGFA₁₈₉, VEGFA₁₆₅ e VEGFA₁₂₁, após o tratamento das células SCC-9 com diferentes concentrações de orlistat (Orl) ou cerulenina (Cer). Em (A) notamos maior expressão dos RNAs mensageiros para VEGFA₁₈₉ nas células tratadas com 300 μM de orlistat, porém o aumento estatisticamente significativo somente foi observado com 100 μM da droga. Em (B), apesar da redução gradual com aumento da concentração de cerulenina, o aumento na expressão de VEGFA₁₈₉ foi estatisticamente significativa em relação ao controle. A expressão dos RNAs mensageiros para VEGFA₁₆₅ foi significativamente aumentada após o tratamento com orlistat ou

cerulenina. Da mesma forma, a expressão dos RNAs mensageiros para VEGFA₁₂₁ foi aumentada de maneira dose-dependente após o tratamento com orlistat ou cerulenina (E e F). (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

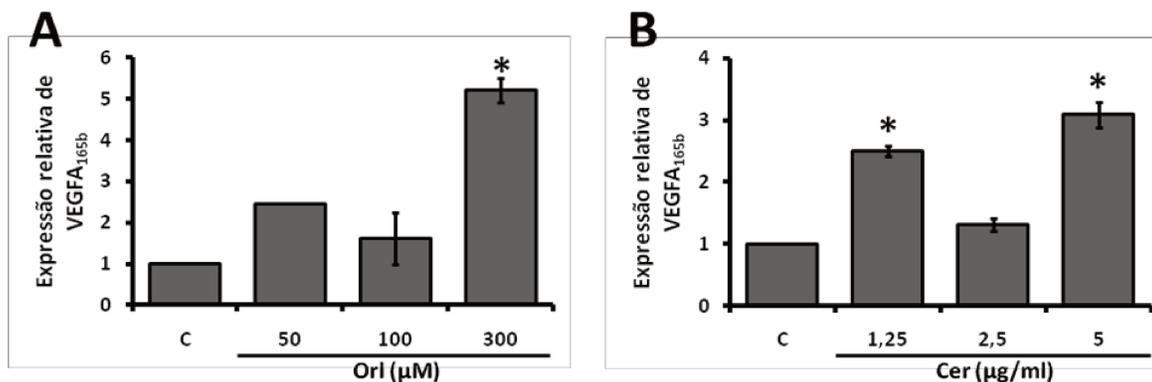


Figura 30—RT-PCR quantitativo realizado para verificação dos níveis de RNAs mensageiros para isoforma anti-angiogênica VEGFA_{165b}, após o tratamento das células SCC-9 com orlistat (Orl) ou cerulenina (Cer). Em (A) notamos significativo aumento de RNAs mensageiros para VEGFA_{165b} após o tratamento com 300 μM de orlistat. O tratamento com 1,2 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de cerulenina foi capaz de aumentar significativamente a expressão de RNAs mensageiros para VEGFA_{165b} nas células SCC-9 (B). (* $p < 0,05$; *test t* de Student).

5.6. Orlistat aumenta a expressão do receptor VEGFR-2 nas células endoteliais RAEC

Os efeitos do orlistat sobre a presença da proteína VEGFR-2 na superfície das células endoteliais foram examinados por citometria de fluxo (Figura 31). O tratamento com esta droga provocou aumento da expressão de VEGFR-2 na superfície celular, aparentemente sem afetar a membrana de forma inespecífica, como mostrado pela marcação com a proteína de membrana CD31, que não se alterou nas diferentes concentrações utilizadas.

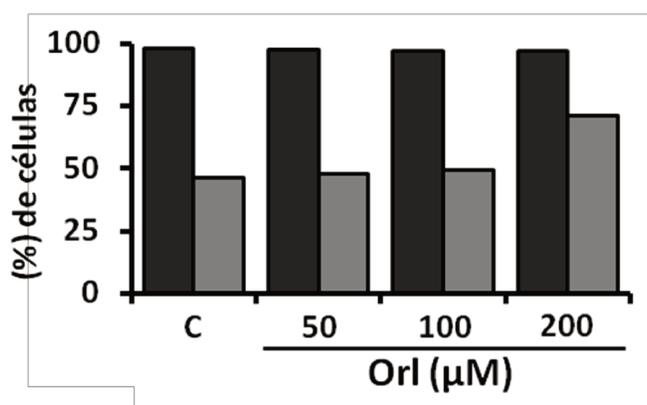


Figura 31- Imunomarcção realizada em citômetro de fluxo, mostrando a porcentagem de células RAEC marcadas por anticorpos anti-CD31 (barras pretas -■-) e anti-VEGFR-2 (barras cinzas-■-), após o tratamento com diferentes concentrações de orlistat. Notamos o discreto e progressivo aumento na positividade para VEGFR-2 nas concentrações de 50 para 100 µM, mais acentuado na concentração de 200 µM. O gráfico representa 1 de 3 experimentos independentes.

6. DISCUSSÃO

A idéia de se verificar o papel da enzima FASN em culturas de células endoteliais foi decorrente 1) do trabalho de Browne et al. (2006), o qual mostrou pela primeira vez que orlistat suprime a proliferação das células endoteliais e a formação de vasos em cultura *ex vivo*, e 2) dos resultados obtidos nos experimentos “*in vivo*” realizados na nossa dissertação de mestrado, sugerindo que FASN é importante para a neovascularização dos melanomas provocados por células B16-F10. Nesta dissertação, observamos significativa redução dos vasos peritumorais nos camundongos tratados com orlistat.

No presente trabalho, o tratamento das células RAEC, derivadas do endotélio da aorta de coelho, com inibidores de FASN provocou inibição da formação de estruturas vasculares *in vitro* e redução significativa da progressão do ciclo celular, caracterizado pelo acúmulo destas células nas fases G0/G1 e redução da fase S do ciclo celular. Estes resultados estão de acordo com Browne *et al.* (2006), que demonstraram que a inibição de FASN por orlistat é capaz de reduzir significativamente a proliferação de células endoteliais HUVEC de maneira dose-dependente, além de reduzir a proliferação de vasos sanguíneos em ensaios *ex vivo*. Em trabalho prévio do nosso grupo, Almeida *et al.* (2005) mostraram que a inibição de FASN por cerulenina também é capaz de reduzir o crescimento de culturas primárias de fibroblastos gengivais humanos normais. Portanto, apesar de muito pouco estudado e discutido na literatura científica, parece existir uma ligação entre a atividade da enzima FASN e a viabilidade e proliferação de células não neoplásicas. Ao contrário, tal associação é muito clara em células malignas em cultura ou em modelos animais para o estudo da progressão tumoral. Por exemplo, diminuição da síntese de DNA, inibição da progressão para a fase S do ciclo celular e morte por apoptose são conseqüências comuns da inibição de FASN com orlistat em células tumorais em cultura (Pizer *et al.*, 1998, Kridel *et al.*, 2004). Menendez *et al.* (2004, 2005a) demonstraram que o tratamento de linhagens celulares derivadas de carcinoma de estômago (NCI-N87) e de mama

(SK-Br3) com orlistat causa, além da inibição da síntese de ácidos graxos, um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, retardando a entrada na fase S. Resultados semelhantes também foram observados no trabalho de Carvalho *et al.* (2008) em células derivadas de melanoma murino. Orlistat causa, além de acúmulo de células em G0/G1, redução da quantidade de Skp2, conseqüente acúmulo de p27^{kip1} e ativação da via de Rb (Knowles *et al.*, 2004, Menendez *et al.*, 2004).

Tanto cerulenina quanto orlistat foram capazes de aumentar significativamente as taxas de apoptose e reduzir a viabilidade das células RAEC. Em concordância, Browne *et al.* (2006) verificaram que o tratamento com orlistat promove a morte por apoptose das células HUVEC em proliferação, ou seja, em subconfluência e estimuladas por VEGFA. Fenômeno semelhante não foi observado por estes autores quando estas células estavam confluentes. Entretanto, no presente estudo, observamos que o tratamento com cerulenina ou com orlistat não reduziu a viabilidade das células HUVEC em subconfluência. Acreditamos que estas discrepâncias sejam decorrentes de características como proliferação lenta e falta de estímulo por VEGFA, o que pode interferir essencialmente na necessidade de ácidos graxos e conseqüentemente na atividade de FASN. Os mecanismos moleculares que ligam a inibição de FASN a promoção da apoptose ainda não foram elucidados. Entretanto, em células neoplásicas, o acúmulo de malonil-CoA, que ocorre após o bloqueio da atividade de FASN, já foi sugerido como provável responsável pelo efeito citotóxico (Pizer *et al.* 2000; Li *et al.* 2001; Thupari *et al.* 2001; De Schrijver *et al.* 2003). Knowles & Smith (2007) demonstraram que o silenciamento de FASN através de RNAi em células derivadas de câncer de mama, além de afetar a transcrição de genes envolvidos no metabolismo tumoral, ocasiona super-regulação de genes que regulam a parada do ciclo celular e apoptose. Zecchin *et al.* (2010) demonstraram que, em células B16-F10, a inibição de FASN com cerulenina ou com orlistat inibe a proliferação e induz morte por apoptose através da via mitocondrial ou intrínseca, com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3. Neste mesmo

estudo, a morte induzida por orlistat foi precedida por estresse oxidativo e aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$, sendo independente da participação de p53, calcineurina ou da abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

O VEGFA é um mitógeno específico para células endoteliais, com papel central na angiogênese em vários processos fisiológicos e patológicos (Ferrara *et al.*, 2002). Considerado como o principal alvo na terapia anti-angiogênica contra o câncer (Catena *et al.*, 2007), o aumento da sua produção é induzido pela exposição das células tumorais a ambientes hipóxicos ou fatores de crescimento e, em ambos os casos, ocorre em grande parte pelo aumento da transcrição do gene *VEGFA*. Este processo é mediado por HIF-1 α , um fator de transcrição heterodimérico cuja atividade é aumentada na hipóxia intratumoral ou devido a alterações genéticas que ativam a via de transdução de sinal MAPK (Semenza *et al.*, 2002; 2003; Powis e Kirkpatrick, *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2004).

Os resultados desta tese mostram maior proliferação das células RAEC quando incubadas pelo meio previamente condicionado pelas células B16-F10. Da mesma forma, maior crescimento das células HUVEC foi observado na presença de meio condicionado pelas células SK-MEL-25 ou SCC-9. Estas observações são, provavelmente, decorrentes do VEGFA secretado pelas células tumorais. De fato, VEGFA, além de ser um dos principais responsáveis pela angiogênese tumoral, é produzido em grandes quantidades na maioria das neoplasias malignas humanas (Ferrara *et al.*, 1997), dentre as quais o melanoma (Potgens *et al.*, 1995; Rennel *et al.*, 2008) e o carcinoma espinocelular bucal (Onesto *et al.*, 2006; Margaritesc *et al.*, 2010). Uma observação importante do presente estudo, que liga a enzima FASN com o controle da produção e secreção de VEGFA, foi que tanto o tratamento com orlistat quanto o silenciamento de FASN com siRNA aumentam expressivamente a quantidade de VEGFA sintetizado pelas células B16-F10, SK-MEL-25 e SCC-9. Isto está em concordância com os achados de Menendez *et al.* (2005), que verificaram que o inibidor de FASN C75, assim como o silenciamento de FASN com siRNA, promovem acúmulo de HIF-1 α e aumento da produção de VEGFA em linhagens celulares derivadas de câncer de mama. Segundo estes

autores, a perturbação do metabolismo dos ácidos graxos endógenos causadas pela inibição de FASN resgata a cascata de sinalização MAPK → HIF-1 α → VEGFA. Estes autores sugerem ainda que o metabolismo dos ácidos graxos endógenos representa uma adaptação metabólica necessária para capacitar as células tumorais a sobreviver em hipóxia.

O gene *VEGFA* codifica várias isoformas que diferem entre si pela quantidade de exons, propriedades biológicas e padrão de expressão. O crescimento e desenvolvimento dos vasos sanguíneos em tumores é dependente do balanço na produção das isoformas de VEGFA, que é controlado por *splicing* alternativo. Foram descritas, até o momento 12 isoformas de VEGFA, divididas em família pró-angiogênica (7 variantes) e família anti-angiogênica (5 variantes), que diferem em seis aminoácidos na porção carboxi-terminal. As variantes anti-angiogênicas são formadas a partir de um *splicing* distal no exon 8, em um sítio denominado *distal Splice site* (DSS), enquanto que as pró-angiogênicas, no sítio proximal do exon 8, chamado *proximal Splice site* (PSS). Estas alterações resultam em mudanças na interação destas moléculas com seus receptores e consequentemente na sua função (revisado por Harper & Bates, 2008). O mecanismo biológico que regula a escolha do *splice site* carboxi-terminal (pró- ou anti- angiogênico) é ainda pouco conhecido e aparentemente determinado por fatores como IGF (para o PSS) e TGF β 1 (para o DSS) (Nowak *et al.*, 2008). Em sua grande parte, os experimentos existentes na literatura para estudar a expressão de VEGFA não fazem a distinção entre as famílias pró- ou anti-angiogênicas destas moléculas. Observamos, no presente trabalho, que o conjunto de fatores VEGFA liberado pelas células B16-F10 após tratamento com inibidores de FASN não foi capaz de aumentar a proliferação das células RAEC, embora tenha mantido a sua viabilidade. As linhagens SCC-9 e SK-MEL-25 tratadas com orlistat parecem induzir um mecanismo anti-angiogênico, resultante da combinação de isoformas de VEGFA secretados. De fato, a proliferação e a formação de estruturas vasculares *in vitro* pelas células HUVEC foram significativamente menores com meios condicionados pelas células neoplásicas

tratadas com orlistat. Uma observação importante foi que, quando as células HUVEC foram expostas somente ao tratamento com orlistat, não houve redução da proliferação e não ocorreu inibição da formação de estruturas vasculares. Este fato demonstra a especificidade da ação do orlistat sobre as células neoplásicas. Em conjunto, estes resultados sugerem que a inibição de FASN por orlistat produz um fenótipo anti-angiogênico em células derivadas de melanoma e carcinoma espinocelular bucal.

De acordo com a literatura, a expressão das isoformas de VEGFA é variável em neoplasias malignas, sendo o *splicing* de VEGFA dinâmico, tanto em tecidos normais como em células malignas (Ferrara *et al.*, 2003; Grunstein *et al.*, 2000). Entretanto, uma das características mais marcantes observada com relação às isoformas é o padrão de vascularização, que parece ser determinado pelo predomínio de alguma variante. Por exemplo, o VEGFA₁₂₁ está envolvido na vascularização peritumoral devido a sua alta difusibilidade (Potgens *et al.*, 1995; Redondo *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002; Grunstein *et al.*, 2000), sendo associado com vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos peritumorais (Küsters *et al.*, 2003). VEGFA₁₈₉, quando expresso de maneira forçada em células de melanoma humano Mel57, promove menos vasodilatação do que VEGFA₁₆₅ e VEGFA₁₂₁ (Küsters *et al.*, 2003). Neste contexto, a expressão forçada de VEGFA₁₂₁ e VEGFA₁₆₅ em células derivadas de melanoma humano em estágio inicial resultou em um crescimento agressivo, em comparação com células transfectadas com VEGFA₁₈₉, que não foram tumorigênicas (Yu *et al.*, 2002). No presente trabalho, encontramos a expressão de RNAs mensageiros para as isoformas VEGFA₁₈₉, VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₂₁ e VEGFA_{165b} em linhagens celulares derivadas de melanoma humano e carcinoma espinocelular bucal. Houve aumento de expressão dos RNAs mensageiros para VEGFA total, VEGFA₁₈₉, VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₂₁ e VEGFA_{165b} após o tratamento com inibidores de FASN, em concordância com o estudo já citado anteriormente, realizado por Menendez *et al.* (2005), no qual a inibição específica da atividade de FASN com C75 ocasionou um aumento de cerca de 500% na produção de VEGFA em células derivadas de

câncer de mama e ovário com alta expressão de ErbB2. Nestas células, o bloqueio da atividade de FASN ativou a via MAPK e causou um acúmulo de HIF-1 α , que por sua vez aumentou a transcrição de VEGFA. É importante notar que, no trabalho de Menendez et al. a cima citado, não foram avaliadas as expressões individuais de cada isoforma de VEGFA, apenas VEGFA total.

Em nosso estudo, não encontramos as variantes anti-angiogênicas VEGFA_{121b} e VEGFA_{189b} nas células SK-MEL-25 e SCC-9. De fato, Varey *et al.* (2008) encontraram, através de reações de PCR e ELISA, que as variantes anti-angiogênicas compreendem cerca de 90% dos mensageiros para VEGFAs em tecidos normais, sendo portanto mais expressas em tecidos normais do que em tecidos neoplásicos. O papel fisiológico das isoformas anti-angiogênicas está sendo intensamente estudado nos tecidos normais e parece que estas moléculas agem como um freio sobre a angiogênese. Artac *et al.* (2009) verificaram que as variantes anti-angiogênicas participam do desenvolvimento ovariano e testicular. Aumento das isoformas anti-angiogênicas parece também estar relacionado com a redução da produção de leite durante a lactação (Qiu *et al.*, 2008). Uma associação entre a queda relativa dos níveis de VEGFA anti-angiogênico e neoformação vascular na retina em diabetes foi também demonstrada (Perrin *et al.*, 2005). Elevados níveis de isoformas de VEGFA anti-angiogênicas também parecem ser necessários durante a gravidez, uma vez que a falta destes fatores no primeiro trimestre de gravidez está associada com o desenvolvimento de patologias materno-fetais (Bills *et al.*, 2009). Nesta pesquisa, mostramos que a inibição de FASN pelo tratamento com 5 μ g/ml de cerulenina ou 300 μ M de orlistat promove aumento significativo da expressão de RNAs mensageiros para variante anti-angiogênica VEGFA_{165b}, nas células SCC-9. Observamos também que com 300 μ M de orlistat e 1,25 μ g/ml de cerulenina houve significativo aumento desta variante nas células SK-MEL-25, em relação aos controles. Na literatura científica, VEGFA_{165b} é fracamente expresso em carcinomas de próstata (Woolard *et al.*, 2004), de rim (Bates *et al.*, 2002) e em melanomas (Pritchard-Jones *et al.*, 2007), sendo que neste último parece prever a sua propagação metastática (Pritchard-

Jones *et al.*, 2007). A função anti-angiogênica da proteína VEGFA_{165b}, foi caracterizada por Woolard *et al.* (2004), que demonstraram que este fator tem propriedades muito diferentes da isoforma mais estudada VEGFA₁₆₅. Aparentemente, o mecanismo pelo qual as isoformas anti-angiogênicas limitam o crescimento endotelial decorre da fraca sinalização desencadeada pela sua ligação com o receptor VEGFR-2 (Woolard *et al.*, 2004; Cebe *et al.*, 2006).

Verificamos aqui um expressivo aumento de RNAs mensageiros das isoformas pró-angiogênicas de VEGFA, concomitante à isoforma anti-angiogênica VEGFA_{165b} nas células SK-MEL-25 e SCC-9 tratadas com orlistat ou cerulenina. No entanto, entendemos, através dos ensaios com meio condicionado, que a função anti-angiogênica de VEGFA_{165b} se sobrepõe ao estímulo pró-angiogênico das isoformas VEGFA₁₈₉, VEGFA₁₆₅ e VEGFA₁₂₁, uma vez que houve significativa redução da proliferação das células HUVEC na presença de meio previamente condicionado pelas células SK-MEL-25 ou SCC-9 tratadas com 300 µM de orlistat.

Observamos também, neste trabalho, um aumento de VEGFR-2 na superfície das células RAEC tratadas com orlistat, por citometria de fluxo. Este achado parece ser específico, pois não houve mudanças no padrão de expressão da proteína CD31 nas mesmas células. Entretanto, em contradição aos nossos achados, Browne *et al.* (2006), verificaram, também por citometria de fluxo, redução da expressão de VEGFR-2 na superfície da célula endotelial HUVEC após o tratamento com orlistat. Uma possível explicação para estas diferenças pode ser com relação as características peculiares a cada linhagem celular. As células RAEC são imortalizadas ao passo que as células HUVEC são provenientes de cultura primária. Por outro lado, pode-se especular que tal aumento na expressão do receptor VEGFR-2 poderia estar ligada ao mesmo efeito “hipoxia-like”, descrito por Menendez *et al.* (2005), onde o aumento da expressão do fator VEGFA promovido pela inibição de FASN, também estimularia a aumento do seu respectivo receptor na superfície da células. Foi relatado, anteriormente aqui nesta tese, que orlistat aumenta a produção de isoformas anti-angiogênicas e como revisado por Harper e Bates, 2008, estes fatores interagem

com o mesmo receptor VEGFR-2 das isoformas pró-angiogênicas. Com base nestas informações, acreditamos também que a competição entre estas moléculas é consistente com a idéia de que a inibição de FASN aumentaria VEGFR-2 na superfície da célula devido a um efeito compensatório, pela falta de estímulo angiogênico. Além disso, a observação de que orlistat altera a expressão de receptores tirosina-quinase na superfície celular corrobora a idéia de que o bloqueio farmacológico da FASN interfere com a localização celular ErbB-2 em células neoplásicas (Menendez *et al.*, 2004).

Em resumo, os achados da presente pesquisa mostram que orlistat e cerulenina foram capazes de inibir a viabilidade, induzir a apoptose e reduzir *in vitro* a formação de vasos sanguíneos pelas células endoteliais RAEC. Embora em células endoteliais HUVEC a viabilidade não tenha sido reduzida pelos mesmos tratamentos, demonstramos que o meio de cultura condicionado pelas células neoplásicas SK-MEL-25 e SCC-9 tratadas com orlistat reduz a formação *in vitro* de vasos sanguíneos e a proliferação das células HUVEC. Em conjunto, nossos resultados sugerem que este fenômeno é decorrente do aumento da expressão da isoforma anti-angiogênica VEGFA_{165b}, promovido também pelo tratamento com inibidores de FASN.

7.CONCLUSÕES

- 7.1. O tratamento com orlistat e cerulenina aumenta as taxas de apoptose, reduz a viabilidade e inibe a formação de estruturas vasculares *in vitro* das células RAEC.
- 7.2. O meio condicionado por células neoplásicas B16-F10, SK-MEL-25 e SCC-9 com orlistat é capaz de inibir ou estabilizar a proliferação das células endoteliais derivadas dos vasos sanguíneos e reduzir a formação de estruturas vasculares *in vitro*.
- 7.3. Cerulenina e orlistat aumentam significativamente a expressão VEGFA total em células B16-F10, assim como a expressão de isoformas pró e anti-angiogênicas de VEGFA nas células SK-MEL-25 e SCC-9.
- 7.4. A inibição de FASN com orlistat aumenta a expressão do receptor VEGFR-2 nas células endoteliais RAEC.

REFERENCIAS

Agostini M, Silva S, 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 (7): 728-735.

Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(2):139-47.

Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DM. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res.* 2005; 65(23):10637-41.

Alli PM, Pinn ML, Jaffee EM, McFadden JM, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene* 2005; 24, 39–46.

Almeida JP, Coletta RD, Silva S, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L *et al.* The proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol.* 2005; 76 (2): 272-278.

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): 1383-1388.

Expression of fatty acid synthase (FASN) in oral nevi and melanoma. de Andrade B, León J, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, Graner E, de Almeida O. *Oral Dis.* 2011;17(8):808-12.

Artac RA, McFee RM, Smith RA, Baltus-Breitwisch MM, Clopton DT, Cupp AS. Neutralization of vascular endothelial growth factor antiangiogenic isoforms is more effective than treatment with proangiogenic isoforms in stimulating vascular development and follicle progression in the perinatal rat ovary. *Biol Reprod.* 2009; 81(5):978-88.

Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SJ, Hirota S, Hosobe S *et al.* Mechanisms of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006; 66 (11): 5953-5940.

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.

Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD *et al.* VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is downregulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 62: 4123–4131

Bergers & Benjamin. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Review Cancer.* 2002.

Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, *et al.* Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J. Clin. Investig.* 1993; 91: 153–159.

Bershtein LM, Pozharisskii KM, Maksimova NA, Kovalevskii Alu, Imianitov EN. An immunohistochemical study of aromatase, estrogen 4-hydroxylase and fatty acid synthetase in breast cancer tissues from BRCA1 mutation carriers. *Vopr Onkol.* 2009; 55(1):29-32.

Browne CD, Hindmarsh EJ, Smith JW. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by Orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J.* 2006; 20: 2027-2035.

Brychtova S, Bezdekova M, Brychta T, Tichy M. The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas. *Neoplasma.* 2008;55(4):273-9

Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, Deberardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL, *et al.* The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene.* 2005; 24(26):4165-73.

Carmeliet P e Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011a; 473 (7347): 298-307.

Carmeliet P e Jain R K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews drug discovery.* 2011b; 24(10).

Carmeliet P, Conway EM. Growing better blood vessels. *Nat Biotechnol.* 2001;19(11):1019-20.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, *et al.* Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998 30;394(6692):485-90. Erratum in: *Nature* 1998 Oct 1;395(6701):525. Keshet E [corrected to Keshert E].

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.

Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B, Javierre B, Carolyn JM, Michael R, *et al.* Increased expression of VEGF₁₂₁/VEGF₁₆₅₋₁₈₉ ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis *Int. J. Cancer* 2007;120, 2096–2109

Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, Montes R, Pio R, Montuenga LM, Calvo A. VEGF_{121b} and VEGF_{165b} are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer.* 2010; 31(9):320.

Cebe SS, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, *et al.* A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci.* (2006) 63: 2067–2077

Chajes V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V. Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res.* 2006; 66: 5287–5294

Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY, and Chung LP. Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum. Pathol.* 1998; 29: 910–914.

Chirala SS, Jayakumar A, Gu Z-W, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98 (6): 3104-3108.

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 USA* 2003; 100 (11): 6358-6363.

Clauss M. *et al.* Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 1990; 172, 1535-1545.

Clegg DJ, Wortman MD, Benoit SC, Mcosker CC, Seeley RJ. Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes* 2002; 51: 3196-3201.

De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W *et al.* RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer*

Research 2003; 63 (13): 3799-3804.

D'Erchia AM, Tullo A, Lefkimmiatis K, Saccone C, Sbisa E. The fatty acid synthase is a conserved p53 family target from worm to human. *Cell Cycle* 2006; 5: 750-758.

Dickson, P. V. *et al.* Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2007 13, 3942–3950.

Ebos JM, Lee CR, and Kerbel RS. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 5020-5025.

Einspahr JG, Thomas TL, Saboda K, Nickolof BJ, Warneke J, Curiel-Lewandrowski C, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression. *Cancer.* 2007; 110(11):2519-27.

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): 81-86.

Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997; 18: 4–25.

Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:795–803.

Ferrara N, *et al.*, Differential expression of the angiogenic factor genes VEGF and EG-VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am. J. Path.* 2003; 162, 1881-1893.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004; 25(4):581-611.

Flavin R, Zadra G, Loda M. Metabolic alterations and targeted therapies in prostate cancer. *J Pathol.* 2011;223(2):283-94.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1(1):27-31. Review.

Fukuda H, Iritani N, Sugimoto T, Ikeda H. Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene by insulin/glucose, polyunsaturated fatty acid and leptin in hepatocytes and adipocytes in normal and genetically obese rats. *Eur J Biochem* 1999; 260: 505-511.

Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, *et al.* Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res.* 2008; 68: 1003–1011.

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):4589-4593.

Gabrielson EW, Pinn ML, Testa JR, Kuhajda FP. Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2001; 7 (1): 153-157.

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): 686-692.

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: 253–261.

Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS. Isoforms of Vascular Endothelial Growth Factor Act in a Coordinate Fashion To Recruit and Expand Tumor Vasculature *Mol Cell Biol.* 2000; 20(19):7282-91.

Guerciolini R. Mode of action of Orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997; 21 (Suppl 3): S12-S23.

Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(11):880-7.

Heemers H, Maes B, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen J. Androgen stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cell lines by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endoc.* 2001; 15 (10): 1817-1828.

Heiligtag SJ, Bredehorst R, David KA. Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002; 9 (9): 1017-1025.

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. Epub 2008 Jul 18.

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991;5:1806–14.

Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastián V, Silipo V, La Torre G *et al.* Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol.* 2003; 30 (1): 23-28.

Ito FA ; Ito, K. ; Coletta, R. D. ; Graner, E ; Almeida, O. P. ; Lopes, M. A. . Salivary gland tumors: immunohistochemical study of EGF, EGFR, ErbB-2, FAS and Ki-67. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, v. 31, p. 280-287, 2009

Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine* 2003, Review.

Jayakumar A, Tai M, Huang W, Al-Fell W, HSU M, Abu-Elheiga L, Chirala SS, Wakil, SJ. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92 (19): 8695-8699.

Kalluri R. Basement membranes: structural features, assembly, cellular interactions and role in cancer angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 .

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

Kapur P, Selim MA, Roy LC, Yegappan M, Weinberg AG. Spitz nevi and atypical Spitz nevi/tumors: a histological and immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 2005b Feb; 18(2):197-204.

Karin M. Inflammation-activated protein kinases as targets for drug development. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):386-90; discussion 394-5.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 2004;5(1):74-80.

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 Jul 1;125(1):249-52

Kim KJ, *et al.*, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. *Nature* 1992, 362, 841-844

Knowles & Smith, 2007

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): 30540-30545.

Knowles LM, Yang C, Osterman A, Smith JW. Inhibition of fatty acid synthase induces caspase-8-mediated tumor cell apoptosis by up-regulating DDIT4. *The Journal Of Biological Chemistry* 2008 283,46, Pp. 31378–31384

Kowanetz e Ferrara. Vascular Endothelial Growth Factor. *Clin Cancer Res* 2006;12(17).

Kridel SJ, Axelrod F, Rosenkrants N, Smith W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Research* 2004; 64: 2070-2075.

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): 325-329.

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 USA*. 2000; 97(7): 3450-4.

Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Eisher SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Research* 2003; 63 (1): 132-139.

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): 71-79.

Küstters B, de Waal RM, Wesseling P, Verrijp K, Maass C, Heerschap A, Barentsz JO, *et al*. Differential effects of vascular endothelial growth factor A isoforms in a mouse brain metastasis model of human melanoma. *Cancer Res*. 2003; 63(17):5408-13

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.

Lei J, Jiang A, Pei D. Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF 183. *Biochim Biophys Acta* 1998;14443:400–6.

Li JN, Gorospe M, Cherst FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WH et al. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Research* 2001; 61 (4): 1493-1499.

Li H, Lü Q, Xue H, Dong LH, Saima N, Yang HJ. Expression of epidermal fatty acid-binding protein and fatty acid synthase in infiltrating ductal breast carcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2008;28(3):381-4. Chinese.

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: 1262–1269.

Liu H, Liu Y, Zhang JT. A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7: 263–270

Lupu R, Menendez JA. Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Curr Pharm Biotechnol*. 2006;7(6):483-93. Review

Maeshima, Y. *et al*. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J. Biol. Chem*. 2001 **276**, 15240–15248.

Mărgăritescu C, Pirici D, Stîngă A, Simionescu C, Raica M, Mogoantă L, Stepan A, Ribatti D. VEGF expression and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and morphometric study. *Clin Exp Med*. 2010;10(4):209-14.

Martel PM, Bingham CM, McGraw CJ, Baker CL, Morganelli PM, Meng ML, Armstrong JM *et al*. S14 protein in breast cancer cells: direct evidence of regulation by SREBP-1c, superinduction with progestin, and effects on cell growth. *Exp. Cell Res*. 2006; 312: 278–288

Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *British Journal of Cancer* 2009, 100, 1369 – 1372.

Mendel, D. B. *et al*. *In vivo* antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin. Cancer Res*. 2003; 9, 327–337.

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

Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, *et al.* Inhibition of fatty acid synthase (FAS) 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. Antitumoral action of the anti-obesity drug orlistat (Xenical TM) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA-3 mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol.* 2005a; 3.

Menendez JA, Vellon L, Oza BP, Lupu R. Does endogenous fatty acid metabolism allow cancer cells to sense hypoxia and mediate hypoxic vasodilatation? Characterization of a novel molecular connection between fatty acid synthase (FAS) and hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha)-related expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cancer cells overexpressing her-2/neu oncogene. *J Cell Biochem.* 2005b; 1;94(5):857-63

Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo M, Zadra G, Inazuka F, *et al.*, Fatty Acid Synthase: A Metabolic Enzyme and Candidate Oncogene in Prostate Cancer. *JNCI.* 2009; 101, 17.

Myers RB, Oelschlager DK, Weiss HL, Frost AR, Grizzle WE. Fatty acid synthase: an early molecular marker of progression of prostatic adenocarcinoma to androgen independence. *J Urol.* 2001; 165(3): 1027-32.

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

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growthfactor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9–22.

Nowak, D. G., *et al.* Expression of pro- and antiangiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by known splicing and growth factors. *J. Cell Sci.* 2008

O'Reilly, M. S. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS.* 1997a 79, 273–294.

O'Reilly, M. S. *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997b 88, 277–285.

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

Ogino S, Shima K, Noshio K, Irahara N, Baba Y, Wolpin BM, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Fuchs CS. A cohort study of p27 localization in colon cancer, body mass index, and patient survival *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Jun;18(6):1849-58.

Okawa Y, Hideshima T, Ikeda H, Raju 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. *Am Soc Microbiol* 1976; 3 (40): 681-697.

Orita H, Coulter J, Lemmon C, Tully E, Vadlamudi A, Medghalchi SM, Kuhajda FP, Gabrielson E. Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2007; 1;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 Apr 15;14(8):2458-64.

Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell.* 1993 4: 1317–1326.

Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimburger DC *et al.* The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 2000; 31 (9): 1068-1073.

Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda F. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Research* 1996; 56 (12): 2745-2747

Pizer ES, Chrest FJ, Diguseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Research* 1998a; 58: 4611-4615.

Pizer ES, Lax SF, Kuhajda FP, Pasternack GR, Kurman RJ. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer* 1998b; 83(3): 528-537.

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 Research* 2000; 60 (2): 213-218.

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, *et al.* VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997;272:7151–8.

Potgens, A. J. G., Lubsen, N. H., van Altena, M. C., Schoenmakers, J. G. G., Ruiter, D. J., and de Waal, R. W. W. Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice. *Am. J. Pathol.*, 146: 197–209, 1995.

Prager G W; M. Poettler. Angiogenesis in cancer. Basic mechanisms and therapeutic advances. 2011; Review.

Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, Harper SJ, Bates DO. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer* 2007 97(2): 223–230

Pyriochou A, Tsigkos S, Vassilakopoulos T, Cottin T, Zhou Z, Gourzoulidou E, Roussos C, Waldmann H, Giannis A, Papapetropoulos A. Anti-angiogenic properties of a sulindac analogue. *Br J Pharmacol.* 2007 Dec;152(8):1207-14. Epub 2007 Oct 29

Redondo, P., Bandres, E., Solano, T., Okroujnov, I., and Garcia-Foncillas, J. Vascularendothelial growth factor (VEGF) and melanoma. *N-acetylcysteine down-regulates VEGF production in vitro.* *Cytokine* 2000; 12: 374–378.

Rennel ES, Waive E, Guan H, Schu"ler Y, Leenders W, Woolard J, Sugiono M, *et al.* The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice *British Journal of Cancer* 2008; 98, 1250 – 1257

Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Molecular Cancer Research.* 2003; 1:(10), 707-715.

Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Dei Tos AP, Fletcher JA, Loda M. Gastrointestinal stromal tumors overexpress fatty acid synthase. *J Pathol* 2006; 209; 369-375.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(10):721-32. Review.

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

Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA; Lopes MA. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncology* 2004; 40: 688-696.

Silva SD, Cunha IW, Rangel AL, Jorge J, Zecchin KG, Agostini M, Kowalski LP, Coletta RD, Graner E. Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. *Virchows Arch.* 2008;453(1):57-67.

Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Review Progress in lipid Research* 2003; 42: 289-317.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 1998 92: 735–745.

Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004;6(5):447-58.

Swinnen JV, Esquet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Research* 1997; 57 (6): 1086-1090.

Swinnen JV, Vanderhoydonc F, Elgamal A *et al.* Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2000a; 88 (2): 176-179.

Swinnen JV, Heemers H, Doboel 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* 2000b (19) 5173-5181.

Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L *et al.* Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 2002; 98 (1): 19-22.

Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F *et al.* Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302 (4): 898-903.

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): 2204-2212.

Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285;(2) 217-223.

Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1991;266:11947–54.

Tober KL, Cannon RE, Spalding JW, Oberyszyn TM, Parrett ML, Rackoff AI, Oberyszyn A S, et al. Comparative expression of novel vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor transcripts in skin, papillomas, and carcinomas of v-Ha-ras Tg. AC transgenic mice and FVB/N mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 247: 644–653.

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 Jun;83(6):586-90

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 Jul;104(7):1790-801.

Uddin S, Jehan Z, Ahmed M, Alyan M, Al-Dayel F, Hussain A, Bavi P. et al. Overexpression of fatty acid synthase in Middle Eastern epithelial ovarian carcinoma activates AKT and its inhibition potentiates cisplatin-induced apoptosis. *Mol Med.* 2011;17(7-8):635-45.

Van de Sande, T., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G. e Swinnen, J. V. 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, 642-6.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493–5.

Visca P, Alò PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F et al. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-relating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res* 1999; 5 (12): 4111-4118.

Visca, P.; Sebastiani, V.; Pizer, E. S.; 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): 335-339.

Vlad LD, Axatidis CA, Merino MJ. Fatty acid synthase is highly expressed in aggressive thyroid tumors. *Mod Pathol* 1999; 12: 70.

Volpert OV, et al., the modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. *Brest Cancer res. Treat.* 1995 36, 119-126.

Wakil, S. J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 1989; 28 (11): 4523-4530.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1994., 269: 26988–26995

Wang X, Tian W. Green Tea Epigallocatechin Gallate: A natural inhibitor of fatty-acid synthase. *Biochl Bioph Res Comm* 2001b 288, 1200–1206

Wang Y, Zhang X, Tan W, Fu J, Zhang W. Significance of fatty acid synthase expression in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2002 May;24(3):271-3.

Wang HQ.; Altomare DA.; Skele KL. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene* 2005; 24: 3574-3582.

Wang WQ, Zhao XY, Wang HY, Liang Y. Increased fatty acid synthase as a potential therapeutic target in multiple myeloma. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2008 Jun;9(6):441-7

Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, *et al.* *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1986; 367, 905-912

Whittle C, Gillespie K, Harrison R, Mathieson PW, Harper SJ. Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin Sci (Lond)* 1999;97:303–12.

Witkiewicz AK, Nguyen KH, Dasgupta A, Kennedy EP, Yeo CJ, Lisanti MP, Brody JR. Co-expression of fatty acid synthase and caveolin-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical outcome. *Cell Cycle.* 2008;7(19):3021-5.

Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, *et al.* VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splicevariant:

mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 2004 64: 7822–7835

Yang Y, Liu H, Li Z, Zhao Z, Yip-Schneider M, Fan Q, Schmidt CM, *et al.* Role of fatty acid synthase in gemcitabine and radiation resistance of pancreatic cancers. *Int J Biochem Mol Biol.* 2011; 2(1):89-98.

Yeo E-J, Chun Y-S, Park J-W. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68: 1061–1069.

Yu JL, Rak JW, Klement G, Kerbel RS. Vascular Endothelial Growth Factor Isoform Expression as a Determinant of Blood Vessel Patterning in Human Melanoma Xenografts. *Cancer Research* 2002; 15: (62) 1838–1846.

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

Zhang, H. T., Craft, P., Scott, P. A., Ziche, M., Weich, H. A., Harris, A. L., and Bicknell, R. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995, 87: 213–219.

Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ES. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(11):1686-96.

Zhao W , Kridel S, Thorburn A, Kooshki M, Little J, Hebbar S, Robbins M. Fatty acid synthase: a novel target for anti-glioma therapy. *British Journal of Cancer* 2006; 95, 869 – 878