



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**DÉBORA CAMPANELLA BASTOS**  
Cirurgiã-dentista

***EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE FASN SOBRE A  
LINFANGIOGÊNESE EM MODELO MURINO***

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

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

**PIRACICABA  
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

B297e	<p>Bastos, Débora Campanella. Efeitos da inibição da atividade de FASN sobre a linfangiogênese em modelo murino. / Débora Campanella Bastos. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Edgard Graner. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. Câncer. 2. Metástase. I. Graner, Edgard. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Effects of inhibition of FASN activity on lymphangiogenesis in mouse model

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Cancer. 2. Metastasis

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Edgard Graner, Jacks Jorge Junior, Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel

Data da Defesa: 26-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata DÉBORA CAMPANELLA BASTOS aprovada.

Handwritten signature of Edgard Graner in blue ink.

PROF. DR. EDGARD GRANER

Handwritten signature of Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel in blue ink.

PROFa. DRa. ANA LÚCIA CARRINHO AYROZA RANGEL

Handwritten signature of Jacks Jorge Junior in blue ink.

PROF. DR. JACKS JORGE JUNIOR

## *DEDICATÓRIA*

---

---

*Aos meus pais, **Levy e Rose**, pelo apoio, confiança em minhas escolhas e principalmente pelo exemplo diário de trabalho, profissionalismo e humildade.*

*Aos meus irmãos, **Erika e Fábio** e ao meu tio **Antônio**, meus maiores amigos, pela convivência e cumplicidade nas mais diversas circunstâncias de nossas vidas.*

*À minha linda sobrinha **Brenda** pelo apoio, ainda que inconsciente, e pela alegria e força interior que nos trouxe com sua chegada.*

*Aos meus queridos avós, **Salvador e Helena**, pela lembrança do mais terno convívio e pela educação que só as pessoas mais sábias são capazes de oferecer.*

*“In Memoriam”*

*Ao meu orientador, **Professor Dr. Edgard Graner**, primeiramente pela oportunidade de realizar os primeiros trabalhos durante iniciação científica, que me fizeram despertar o interesse pela Biologia Celular e Molecular. Registro também toda a minha gratidão pela confiança em entregar parte de seu projeto e todo o meu respeito e admiração pela simplicidade e humildade com que conduziu este trabalho.*

## *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. Francisco Haiter Neto**;

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos Profs. Drs. **Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Oslei Paes de Almeida**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, que me fizeram despertar o interesse por essa área, desde a época de graduação. Registro aqui toda minha admiração pela competência e seriedade com que realizam suas funções de ensino e pesquisa nesta instituição;

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 07/57402-02);

Às amigas Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup>. **Ana Lúcia Rangel, Karina Gottardelo Zecchin e Michelle Agostini**, pela amizade e por terem compartilhado o imenso conhecimento que vocês adquiriram. Espero poder fazer o mesmo e com a mesma capacidade quando essa responsabilidade me for concedida;

Aos amigos **Fabiana e Marco Antônio** pelo companheirismo e cumplicidade com que realizamos nossos trabalhos, meu mais sincero agradecimento. Divido com vocês os méritos deste trabalho, pois sem vocês não seria capaz de fazê-lo;

Ao meu namorado **Marco** pelo amor que nos une e pelo incentivo, paciência e companheirismo sem os quais essa etapa seria muito mais difícil. Meu agradecimento mais que especial pelo seu talento e conhecimento que ajudou a tornar melhor este trabalho através dos desenhos e montagens das imagens;

Aos meus primos **Sônia e Marcelo** pela amizade e lembranças da nossa infância, pela força mútua que nos damos e pelo convívio maravilhoso. Mais do que primos-irmãos, meus grandes amigos;

Aos meus grandes amigos de faculdade **Ana Cláudia, Débora, Luís, Marcelo, Rodolfo e Paulinha** pela amizade, incentivo e momentos descontraídos desde as primeiras aulas até hoje. Durante quatro anos passamos grande parte das horas dos nossos dias juntos, agradeço todos os dias por essa convivência;

Às minhas atuais e antigas companheiras de república e amigas, **Cláudia, Cristina, Juliana, Marcela, Taciana e Thaís**, mais do que dividirmos a moradia dividimos também nossas angústias, desilusões e alegrias. Obrigada pelos conselhos e pela convivência quase familiar;

Às amigas, **Ana Teresinha, Fernanda e Lívia** pelo apoio, troca de conhecimentos e principalmente pela amizade verdadeira;

Às amigas do laboratório **Andréia, Carol e Lays** pelas experiências e conhecimentos compartilhados, pelos momentos descontraídos que passamos e mais que isso pela amizade construída e solidificada;

Aos amigos da pós-graduação **Adrielle, Alan, Andréia, Bruno, Camila, Carol, Daniel, Fernanda Basso, Jorge, Lília, Luís, Mário, Michele Kellermann, Rebeca, Renato, Patrícia, Patrícia Feio e Victor** pelos momentos de estudo e diversão compartilhados;

À Sra. **Valéria**, técnica do laboratório de Patologia, pela amizade e ensinamentos das técnicas histológicas, necessárias para realização deste trabalho;

Ao biólogo, **Sr. Adriano Luís Martins** funcionário do laboratório de Patologia pelos ensinamentos sobre os equipamentos e soluções do laboratório;

Aos demais funcionários do laboratório de Patologia, **Sr. João Carlos Gomes da Silva Júnior, Juliana, Rosa Maria Fornasier** e aos funcionários do Orocentro **Sra. Aparecida Conceição Campion, Débora e Rogério**, pela colaboração e generosidade.

*“A ciência não é somente a procura pela verdade, não é somente um jogo desafiador, ou uma profissão. Ela é uma vida levada por diversas pessoas, coletivamente, como em uma escola onde se aprende a viver em sociedade, da forma mais coletiva possível, onde somos membros uns dos outros.”*

Sandy Ogston

A enzima ácido graxo sintase (FASN) é responsável pela síntese endógena de ácidos graxos, e tem alta expressão em diversas neoplasias malignas, pois sua atividade parece ser necessária para a síntese dos fosfolípidios de membrana das células tumorais. A droga orlistat (Xenical®), usada para tratamento de obesidade, foi recentemente descrita como tendo propriedades anti-neoplásicas em câncer de próstata, mama e melanoma devido à sua capacidade de bloquear especificamente a atividade de FASN. O tratamento de células endoteliais com orlistat bloqueia a síntese de ácidos graxos e inibe a proliferação e a neovascularização em ensaio *ex vivo*, o que sugere um papel antiangiogênico. O sistema linfático é o componente da circulação responsável pela drenagem do fluido intersticial e é essencial no funcionamento do sistema imunológico além disso os vasos linfáticos são também a via primária de metástase de várias neoplasias malignas, dentre elas o melanoma, neoplasia maligna originada nos melanócitos da pele ou mucosas que apresenta alto índice de metástases e é resistente à quimioterapia. A linfangiogênese (formação de novos vasos linfáticos) é iniciada pela liberação de fatores de crescimento que induzem a proliferação e aumento de permeabilidade das células endoteliais linfáticas. Os fatores de crescimento VEGF-C e VEGF-D e seus receptores VEGFR-2 e VEGFR-3 estão relacionados com a progressão tumoral. Existe uma correlação positiva entre a linfangiogênese e a presença de metástase em linfonodos sentinela e uma correlação inversa com a sobrevida livre de doença, o que indica que vasos linfáticos representam um alvo para avaliação do prognóstico ou terapia contra metástases. Em trabalho recente realizado por nosso grupo, foi demonstrado que o tratamento de camundongos portadores de melanomas intraperitoneais causados pela injeção de células B16-F10 com orlistat reduziu em 50% o número de metástases para linfonodos mediastínicos. Como não há informação na literatura sobre a relação de FASN e linfangiogênese, nosso trabalho teve como

objetivo principal estudar o efeito da inibição da enzima FASN na neoformação linfática em modelos experimentais, através da injeção de células de melanoma murino B16-F10 nas orelhas de camundongos C57Bl6 e indução de reação inflamatória através de feridas circulares nas orelhas de camundongos Balb-C. Por meio de microlinfangiografia fluorescente, técnica que permite a visualização de vasos linfáticos através da injeção intradérmica de uma solução de dextrano a 1% marcado com FITC e avaliação da rede linfática no programa Scion Image, foi observado que a densidade de vasos linfáticos nas orelhas dos camundongos Balb-C e C57Bl6 tratados com orlistat aumentou em relação ao grupo controle. Em resumo nossos resultados mostram que a inibição de FASN com orlistat aumenta a extensão, ramificação e/ou permeabilidade dos linfáticos em região peritumoral (ou ao redor de feridas cirúrgicas).

Palavras chave: câncer / ácido graxo sintase / orlistat / biologia tumoral / linfangiogênese / microlinfangiografia fluorescente

## ***ABSTRACT***

---

---

Fatty acid synthase (FASN) is the metabolic enzyme responsible for the endogenous biosynthesis of fatty acids. FASN is overexpressed in several malignant neoplasms and its activity seems to be necessary for the synthesis of membrane phospholipids in the tumor cells. The drug orlistat (Xenical<sup>®</sup>), which is clinically used for the treatment of obesity, have shown anti-cancer properties in prostate and breast cancer and melanoma due to its ability to specifically block FASN activity. It was recently demonstrated that treatment of endothelial cells with orlistat blocks the synthesis of fatty acids and inhibits the proliferation and neovascularization. The lymphatic system is the component of the blood circulation responsible for the drainage of interstitial fluid, what is essential to the function of the immune system. Lymphatic vessels are also the primary route of metastasis in several malignancies such as melanoma, wich is originated in the skin or mucous membranes and shows high rates of metastasis and resistency to chemotherapy. Lymphangiogenesis is initiated by the release of growth factors that induce the proliferation and increased permeability of lymphatic endothelial cells. The growth factors VEGF-C and VEGF-D and their receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 have been related with tumor progression. There is a positive correlation between lymphangiogenesis and the presence of metastasis in sentinel lymph nodes. An inverse correlation between lymphangiogenesis and disease-free survival has also been described, suggesting that lymphatic vessels could be a target against metastasis. We have shown, in a recent study done by our group, that the orlistat treatment was able to reduced by 50% the number of experimental melanoma metastasis to mediastinal lymph nodes. Since there is no information in the literature about the effect of FASN inhibition on lymphangiogenesis, the purpose of this work was to study the consequences of the orlistat treatment in lymphatic neoformation by using two experimental models. In the first, B16-F10 murine melanoma cells were injected in the ears of C57Bl6 mice in order to induce

lymphangiogenesis around the tumors. In the second model, circular wounds were done in the ears of Balb-C mice to induce a local inflammatory reaction and lymphangiogenesis. Lymphatics vessels were observed with the aid of fluorescent microlymphangiography, that allows the observation of the lymphatic vessels by intradermal injection of a solution of 1% of FITC- conjugated dextran. The extension of the lymphatic network was determined by using the Scion Image software. The density of lymphatic vessels significantly increased in both Balb-C and C57Bl6 mice treated with orlistat in comparison to the controls. Moreover, the size of the primary tumors and metastatic lymph nodes were measured and their volumes calculated. In summary, our results show that the inhibition of FASN with orlistat increases the extension, branching and/or permeability of the lymphatics vessels in the peritumoral region and around surgical wounds.

Key words: cancer / fatty acid synthase / orlistat / tumor biology / lymphangiogenesis / fluorescence microlymphangiography

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

---

---

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: *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

FITC: Fluorescein isothiocyanate - Isocianeto de fluoresceína

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

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

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

---

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	5
2.1. Ácido graxo sintase (FASN)	5
2.1.1. Regulação da expressão de FASN	7
2.2. Inibidores específicos de FASN	9
2.2.1. Efeitos biológicos da inibição da expressão e atividade de FASN	11
2.3. Angiogênese	12
2.3.1. Angiogênese tumoral	14
2.4. Linfangiogênese	17
2.4.1. Linfangiogênese tumoral	17
2.5. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	19
2.6. Fator indutor de hipóxia (HIF-1)	21
2.7. Melanoma	22
<b>3. OBJETIVOS</b>	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
4.1. Cultura de células	27
4.2. Preparo das soluções de orlistat	28
4.3. Modelos animais para estudo da linfangiogênese	28
4.3.1. Avaliação da linfangiogênese na cauda de camundongos Balb-C por microlinfangiografia fluorescente	29
4.3.2. Avaliação da linfangiogênese em orelhas de camundongos Balb-C por microlinfangiografia fluorescente	32
4.3.3. Avaliação dos vasos linfáticos peritumorais por microlinfangiografia fluorescente	33
4.4. Preparação do material para análise microscópica	35
4.5. Preparação dos extratos protéicos e reações de western blotting	36
4.6. Purificação de RNA e RT-PCR semi-quantitativo	37

<b>5. RESULTADOS</b>	39
5.1. Avaliação da linfangiogênese na cauda de camundongos Balb-C por microlinfangiografia fluorescente	39
5.2. Avaliação da linfangiogênese em orelhas de camundongos Balb-C e C57Bl6 por microlinfangiografia fluorescente	41
5.3. Efeito do tratamento com orlistat nos tumores primários e linfonodos metastáticos	45
5.4. Análise microscópica dos tumores primários e metástases	51
5.5. Expressão das proteínas FASN e VEGFR-3 nos tumores primários e metástases em linfonodos cervicais	55
5.6. Padronização dos primers para detecção de VEGF-C e VEGF-D através de RT-PCR	60
<b>6. DISCUSSÃO</b>	63
<b>7. CONCLUSÕES</b>	71
<b>REFERÊNCIAS</b>	73
<b>ANEXOS</b>	
<b>ANEXO I:</b> Certificado de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa animal	103

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

O sistema linfático é um importante componente da circulação e tem como função primária manter o equilíbrio osmótico e hidrostático entre o espaço intersticial e os capilares sanguíneos (Swartz *et al.*, 2001). Os linfáticos também têm grande importância no sistema imunológico, pois participam do transporte de células inflamatórias e de antígenos do interstício até os linfonodos. Em indivíduos portadores de tumores, os linfáticos também podem atuar como barreira contra a disseminação de células neoplásicas, drenando-as para os linfonodos e evitando que estas caiam diretamente na corrente sanguínea. Porém, muitas vezes ao invés de serem eliminadas pelo sistema imunológico, as células neoplásicas conseguem proliferar nos linfonodos ou mesmo atingir outros órgãos por disseminação linfática, formando metástases. Em várias neoplasias malignas como as de mama, colo de útero, próstata, pulmão, melanoma e carcinoma espinocelular bucal a principal via de metástase é a linfática. A presença de células neoplásicas em linfonodos regionais é um fator importante no estadiamento destes tumores e planejamento do tratamento cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico (Taipale *et al.*, 1999; Fidler, 2001). A linfangiogênese (processo pelo qual novos vasos linfáticos são formados) tem recebido considerável atenção devido à identificação de proteínas que são especificamente expressas em vasos linfáticos e que podem guiar o seu crescimento (Oh *et al.*, 1997; Jeltsch *et al.*, 1997; Achen *et al.*, 1998; Mandriota *et al.*, 2001; Skobe *et al.*, 2001a e b; Veikkola *et al.*, 2001; Stacker *et al.*, 2001). Em resposta a mediadores moleculares, como os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), tanto as células endoteliais linfáticas quanto sanguíneas proliferam e migram (Witte *et al.*, 1997; Risau *et al.*, 1997). Os membros da família VEGF são elementos importantes no processo de angiogênese e linfangiogênese, atuando em condições fisiológicas ou patológicas. A família VEGF é composta por 7 membros (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e PlGF) com

diferentes propriedades biológicas. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-E, VEGF-F e PlGF têm grande importância no processo de angiogênese e vasculogênese, enquanto que o VEGF-C e VEGF-D estão ligados aos processos de linfangiogênese e metástase linfática (Skobe *et al.*, 2001a; Stacker *et al.*, 2001; Padera *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2002; Karkkainen, 2004). Seus receptores (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3), que possuem atividade de tirosinaquinase, são expressos na superfície de células endoteliais. Em um tecido adulto normal, o processo de linfangiogênese é mínimo (Björndahl *et al.*, 2005), no entanto condições patológicas como a cicatrização de feridas, processos inflamatórios, crescimento tumoral e geração de metástases estão associadas a uma rápida linfangiogênese e angiogênese (Carmeliet & Jain *et al.* 2000; Skobe *et al.*, 2001a e b; Stacker *et al.*, 2002; Leiter *et al.*, 2004; Saharinen *et al.*, 2004; Hirakawa *et al.*, 2007).

A ácido graxo sintase (FASN) é a enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos. Sua expressão é alta em diversas neoplasias malignas, o que sugere que ela tenha um papel essencial no fenótipo agressivo das células malignas e possa ser um alvo terapêutico para o tratamento de diversos tipos de câncer (Kuhajda, 2000; Swinnen *et al.*, 2000a). Innocenzi *et al.* (2003) demonstraram, através de reações imunohistoquímicas, que esta enzima é altamente expressa em melanomas, observando também uma correlação positiva entre expressão de FASN e índice Breslow (sistema usado para o estadiamento destes tumores). Além disso, a alta expressão de FASN está associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e conseqüentemente pior prognóstico. O tratamento de linhagens celulares provenientes de tumores de próstata, mama, gastrointestinais, endometriais, de ovário e mucosa bucal com inibidores específicos da atividade da FASN (cerulenina, c75 ou orlistat) tem como conseqüência a diminuição na síntese de ácidos graxos, bloqueio do ciclo celular, diminuição da proliferação e um aumento significativo do número de células em apoptose (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998a; Li *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005a; Menendez *et al.*, 2006; Knowles *et al.*, 2008). Os mecanismos biológicos que governam as

interações entre a atividade lipogênica e as moléculas que controlam o ciclo celular ainda não são conhecidos. A produção de FASN é regulada por ErbB2 e ambas relacionadas com a presença de HIF-1 $\alpha$ , uma proteína mitogênica que regula a expressão de vários genes, dentre os quais o que codifica o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O orlistat é uma droga anti-obesidade com propriedades citostática e citotóxica para células tumorais, por atuar como inibidor do domínio tioesterase de FASN. Browne *et al.* (2006) demonstraram que esta droga também inibe FASN nas células endoteliais, bloqueando a síntese de ácidos graxos e prevenindo a proliferação. Além disso, estes autores mostraram que o orlistat inibe a neovascularização humana em ensaio *ex vivo*, o que sugere uma atuação como droga anti-angiogênica por prevenir a expressão do VEGFR-2 na superfície das células endoteliais.

Em recente estudo realizado por nosso grupo, no Laboratório de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP (Carvalho *et al.*, 2008), células B16-F10 foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos C57BL6 e resultaram no desenvolvimento de tumor primário com formação de metástases nos linfonodos mediastínicos em 100% dos casos. O tratamento destes animais com orlistat reduziu em 50% o número de linfonodos metastáticos. Menendez *et al.* (2004) mostraram que FASN regula a expressão do receptor de superfície ErbB2 em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário. Foi observado, neste trabalho, que a inibição farmacológica de FASN com orlistat, assim como a utilização de RNAs de interferência (RNAi) para inibir a produção de FASN, suprimiu a expressão de ErbB2. Portanto, FASN pode ter uma ligação direta com a patogênese de certas formas de câncer, pois interfere na produção de proteínas oncogênicas. Em estudo realizado por Menendez *et al.* (2005b), a inibição específica da atividade de FASN com c75 ocasionou um aumento dose-dependente da expressão de VEGF (maior do que 500%) em células de câncer de mama com alta expressão de ErbB2. Ao mesmo tempo, o bloqueio da atividade de FASN ativou drasticamente a via MAPK causando um acúmulo de HIF-1  $\alpha$  nestas mesmas células. O aumento da expressão de VEGF, ativação de MAPK e

aumento da expressão de HIF-1  $\alpha$  também foram observados quando o gene da FASN foi silenciado através de RNAi. Portanto, a inibição do metabolismo endógeno de ácidos graxos nas células tumorais desencadeia uma reação semelhante ao que ocorre em condições de hipóxia, que ativamente recupera a cascata MAPK-HIF-1  $\alpha$  -VEGF dependente de ErbB2.

O objetivo deste trabalho foi verificar se a inibição da atividade de FASN com orlistat interfere no processo de linfangiogênese, o que poderia explicar, pelo menos em parte, o poderoso efeito anti-metastático observado em nossos estudos anteriores (Carvalho *et al.*, 2008). Para isto, utilizamos a técnica de microlinfangiografia fluorescente em orelhas de camundongos Balb-C, nos quais foi induzida reação inflamatória por meio de uma perfuração, ou de camundongos C57Bl6, nos quais células de melanoma foram injetadas intradermicamente.

## ***2. REVISÃO DE LITERATURA***

---

---

### **2.1. Ácido graxo sintase (FASN)**

Os ácidos graxos e seus derivados fazem parte da estrutura das membranas celulares, atuam como hormônios e mensageiros intracelulares e são importantes substratos para o metabolismo energético. A ácido graxo sintase (FASN) é uma enzima citosólica multifuncional responsável pela síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda, 2000; Brink *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2004; Menendez & Lupu, 2007). Estruturalmente, ela é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas (250 a 270 kDa cada) que contém sete diferentes sítios catalíticos seqüencialmente organizados, além de um sítio para a proteína carregadora de acil (Wakil 1989; Brink *et al.*, 2002). Os sítios catalíticos que compõem a FASN estão distribuídos, a partir da extremidade amino terminal em direção a carboxil terminal, na seguinte ordem:  $\beta$ -cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transacilases (que funcionam como sítios de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para a subsequente reação de condensação), desidratase, enoil redutase,  $\beta$ -cetoacil redutase e proteína carregadora de acil (que atuam como redutores, sobre o produto formado pela  $\beta$ -cetoacil sintase) e por fim, o sítio tioesterase, localizado na região carboxil terminal (que promove a hidrólise do palmitato, a seguir liberado como a molécula de ácido graxo recém sintetizada) (Wakil, 1989).

Em condições normais FASN é importante para inúmeros processos biológicos, como armazenamento de energia, produção de ácidos graxos durante a lactação, síntese de membranas celulares, manutenção do ciclo endometrial em fase proliferativa e produção da substância surfactante nos pulmões em desenvolvimento (Kuhajda *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001). Sua expressão, entretanto, é baixa ou até mesmo ausente na maioria dos tecidos humanos adultos normais, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos usados pelas células provém da

dieta (Kuhajda, 2000; Kuhajda *et al.* 2000; Menendez *et al.*, 2005c). A enzima FASN é também denominada antígeno oncogênico-519 (AO- 519; Kuhajda *et al.*, 1994) e está presente em quantidades elevadas em diversos tipos de neoplasias malignas, como as de mama (Wang *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008), cólon (Visca *et al.*, 1999; Ogino *et al.*, 2008), 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), endométrio (Pizer *et al.*, 1998b; Tsuji *et al.*, 2004), carcinoma de células renais (Horiguchi *et al.*, 2008), 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); carcinomas espinocelulares bucais (CECs) (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008) e melanomas (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur, 2005a; Kapur, 2005b), além de sarcomas de tecidos moles (Rossi *et al.*, 2006). Em alguns destes tumores a alta expressão desta enzima está associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e conseqüentemente pior prognóstico (Epstein *et al.*, 1995; Gansler *et al.*, 1997; Vlad *et al.*, 1999; Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Innocenzi *et al.*, 2003; Takahiro *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005b; Horiguchi *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2008).

A conexão entre a biosíntese de lipídios e o controle do ciclo celular ainda não é conhecida. Entretanto, Swinnen *et al.* (2003) demonstraram experimentalmente que a atividade de FASN é necessária para a produção dos fosfolipídios que compõe as membranas das células LNCaP (linhagem 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 profundos 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, processo aparentemente acelerado em células tumorais, esta pode ser um alvo terapêutico para o tratamento de diversos tipos de câncer (Kuhajda,

2000; Swinnen *et al.*, 2000a; Gabrielson *et al.*, 2001; Kuhajda, 2006). Segundo Menendez & Lupu (2007) FASN não somente participa das vias de transdução de sinais, do metabolismo, regula a proliferação e favorece a sobrevivência de células tumorais, mas também modula o desenvolvimento, manutenção e progressão metastática das neoplasias malignas humanas.

Innocenzi *et al.* (2003) demonstraram, através de reações imunohistoquímicas, que FASN é altamente expressa em melanomas, observando também uma correlação positiva entre a sua expressão e o índice Breslow (distância em milímetros desde a camada nucleada mais superficial até o nível mais profundo de invasão). Além disso, houve uma correlação inversa entre a quantidade de FASN e tempo de sobrevida total, indicando que uma alta produção de FASN está associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e conseqüentemente pior prognóstico para os pacientes. Kapur *et al.* (2005a) avaliaram a expressão imunohistoquímica de FASN em 155 lesões melanocíticas cutâneas, verificando uma crescente expressão de FASN em nevos, melanomas primários e metastáticos. Mostraram também uma correlação positiva entre expressão de FASN e os índices de Breslow e de Clark (correlaciona o nível anatômico de invasão associado ao índice mitótico), indicadores de comportamento biológico agressivo.

### **2.1.1. Regulação da expressão de FASN**

A biosíntese endógena de ácidos graxos é catalizada no fígado e tecido adiposo pela FASN, sendo estimulada pela alta concentração de carboidratos e suprimida pela presença de ácidos graxos na dieta (Fukuda *et al.*, 1999). Embora os mecanismos responsáveis pela super-expressão de FASN em tumores não sejam completamente entendidos, duas vias têm sido demonstradas. Primeiro, fatores de crescimento (EGF) e receptores de fatores de crescimento (EGFR ou ErbB1 e ErbB2) são os maiores responsáveis pela alta expressão de RNAs mensageiros de FASN em células tumorais (Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2004). Menendez *et al.* (2004) mostraram, em linhagens celulares de câncer

de mama e de ovário, que a inibição (farmacológica ou via RNAi) de FASN suprime a expressão de ErbB2 através da super-regulação de PEA3, um repressor da transcrição de ErbB2. Estes efeitos são complexos e envolvem a ativação e/ou ligação cruzada entre múltiplas vias de transdução de sinais, como por exemplo a ativação da via de sinalização fosfatidilinositol-3 quinase (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 (proteína-quinase ativada por mitógeno) que desencadeia uma cascata de sinais que culmina com a ativação do ciclo celular (Menendez *et al.*, 2005). O segundo mecanismo bem descrito envolve a regulação hormonal da expressão gênica de FASN, em células tumorais sensíveis a estrógeno, progesterona e andrógenos (Swinnen *et al.*, 1997a e b; Kuhajda, 2000; Menendez *et al.*, 2005). Está demonstrado que 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 regulatórios desses 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 (*sterol regulatory element binding proteins*), especialmente pela modulação de SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein-1c*) (Swinnen *et al.*, 1997). As 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).

## 2.2. Inibidores específicos de FASN

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 anti-fúngicas. 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  $\beta$ -cetoacil sintase (responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA) (Kuhajda *et al.*, 2000). No entanto, a aplicação clínica da cerulenina é limitada, devido a sua instabilidade, causada pela presença de um grupo epóxi extremamente reativo (Lupu & Menendez, 2006). c75 é uma pequena molécula sintética com cadeia de 7 carbonos ( $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -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 produzem 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 (Pizer *et al.* 2000). Nestes trabalhos, os autores injetaram células derivadas de câncer de ovário humano (OVCAR-3) no peritônio de camundongos *nude* e observaram tumores de tamanho menor nos animais tratados com cerulenina ou c75 (Pizer *et al.*, 1998a). Os mesmos autores (Pizer *et al.*, 2000) relataram uma marcante redução da síntese de ácidos graxos e do tamanho dos tumores, 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 super-expressam ErbB2 e desenvolvem câncer de mama de forma espontânea, tiveram uma significativa diminuição no aparecimento dos tumores quando tratados com c75. Segundo estes autores, apenas 20% dos camundongos tratados desenvolveram carcinomas de mama, em comparação com 50% dos animais do grupo controle. Estes resultados sugerem um efeito quimiopreventivo da inibição de FASN no câncer de mama.

Orlistat (tetrahidrolipstatin, comercializado pela Roche como Xenical®) é um fármaco já aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA), derivado semi-sintético da lipstatina, utilizado para o tratamento da obesidade por inibir irreversivelmente a ação de lipases gástricas e pancreáticas (Guerciolini *et al.*, 1997). Orlistat é capaz de bloquear também a função tioesterase da FASN, responsável pela liberação do palmitato (Kridel *et al.*, 2004). Foi demonstrado que esta droga possui efeito anti-proliferativo e anti-tumoral em células de câncer de mama e de próstata e em modelo xenográfico (Menendez *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 2004). 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, evitando a entrada na fase S, 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<sup>Kip1</sup>. Em recente estudo realizado por nosso grupo, no Laboratório de Patologia Bucal FOP-UNICAMP (Carvalho *et al.*, 2008), células B16-F10 foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos C57BL6 e resultaram no desenvolvimento de tumor primário com formação de metástases nos linfonodos mediastínicos em 100% dos casos. O tratamento destes animais com orlistat reduziu em cerca de

50% o número de linfonodos metastáticos. Além disso, no mesmo trabalho, experimentos de citometria de fluxo mostraram que o tratamento destas células com orlistat inibiu a proliferação, com bloqueio da passagem para a fase S do ciclo celular, o que foi confirmado por um aumento na quantidade da proteína p27<sup>Kip1</sup> e concomitante redução de Skp2.

Triclosan (5-cloro-2-[2,4-diclorofenoxi]fenol) é agente anti-séptico utilizado em sabonetes, dentrífcios e enxaguatórios bucais, que bloqueia a atividade de FASN pela inibição do domínio enoil redutase (Liu *et al.*, 2002). A substância EGCG (epigalocatequina-3-galato) é um componente do chá verde que tem demonstrado atividades comparáveis as da cerulenina e do c75, por bloquear a FASN no sítio β-cetoacil redutase (Wang & Tian, 2001).

Apesar de promissores, os estudos que visam a inibição farmacológica de FASN como uma forma de quimioterapia para o tratamento de neoplasias malignas devem ser interpretados com cautela. 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.

### **2.2.1 Efeitos biológicos da inibição da expressão e atividade de FASN**

A maneira pela qual a inibição da FASN desencadeia a apoptose ainda não está clara, embora alguns mecanismos tenham sido propostos. O acúmulo de malonil-CoA após o tratamento com inibidores de FASN pode mediar, ao menos em parte, a citotoxicidade resultante da inibição da FASN através do 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). Segundo Pizer *et al.* (1998a), seu efeito não se deve a uma ação direta no DNA ou na maquinaria de replicação e envolve a função de p53, a qual foi relacionada 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, pois a inibição de FASN resulta na 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, que por sua vez inibe a enzima de membrana mitocondrial CPT-1, responsável pela transesterificação de ácidos graxos de cadeia longa (na forma de acil-CoAs) em acil-carnitina, o que faz com que estes entrem 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- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), 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 (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) e DAPK2 (*death-associated protein kinase 2*). Estudos recentes do nosso laboratório têm demonstrado que 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. A morte induzida por orlistat é precedida por estresse oxidativo (EROs e  $[Ca^{2+}]_{cit}$ ) e, em ambos os casos, a apoptose é independente da participação de p53, calcineurina ou abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Zecchin *et al.*, dados não publicados).

### **2.3. Angiogênese**

A neovascularização ou formação de novos vasos ocorre através de dois processos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese ocorre a partir da diferenciação de células endoteliais precursoras (angioblastos), enquanto que a angiogênese é a formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes (Risau & Flamme, 1995; Risau, 1997; Carmeliet, 2000; Kurz, 2003). Um terceiro

processo de formação de vasos sanguíneos é a arteriogênese, que é o remodelamento estrutural de vasos colaterais pré-existentes, dirigido em parte, por estresse vascular (revisado por Ucuizian *et al.*, 2007). Em embriões, os vasos sanguíneos são formados pela angiogênese e vasculogênese. Atualmente sabe-se que a vasculogênese não ocorre apenas durante a embriogênese e que os dois processos de neovascularização podem coexistir. Em adultos, a formação de novos vasos sanguíneos é observada em certas situações fisiológicas como durante o ciclo ovariano, na placenta durante a gravidez e durante a cicatrização de feridas, na maioria das vezes por angiogênese (Vailhé *et al.*, 2001). A desregulação da angiogênese também tem sido implicada na patogênese de doenças como retinopias vasculares e artrite reumatóide (Folkman *et al.*, 1995). O processo de angiogênese envolve uma interação complexa entre a matriz extracelular e células vasculares e inicia-se com o recrutamento e proliferação de células endoteliais que são capazes de produzir proteases e induzem a degradação da membrana basal de um vaso pré-existente. A seguir, ocorre a invasão e migração das células endoteliais para o espaço intersticial, proliferação, formação do lúmen e, finalmente, o recrutamento de células musculares lisas que conferem estabilização e manutenção do novo vaso. Este processo é mediado pela participação de vários indutores da angiogênese, incluindo fatores de crescimento, quimiocinas, enzimas angiogênicas, receptores endoteliais específicos e moléculas de adesão (Mignatti & Rifkin, 1996). O processo de invasão e migração das células endoteliais requer a cooperação do sistema ativador de plasminogênio (PA) e das metaloproteínases de matriz (MMPs). Após a degradação proteolítica da matriz extracelular, as células endoteliais começam a migrar e proliferar, estimuladas por uma variedade de fatores de crescimento. Os fatores indutores de angiogênese podem ser divididos em três classes (Klagsbrun & Moses, 1999). A primeira classe consiste na família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e das angiopoietinas, que agem especificamente nas células endoteliais. A segunda classe inclui principalmente moléculas de ação direta, como citocinas, quimiocinas e enzimas angiogênicas que atuam numa

ampla variedade de células alvo, além das células endoteliais. Um dos membros deste grupo é o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2), um dos primeiros peptídeos angiogênicos a ser caracterizado (Moore *et al.*, 1998; Brown & Bicknell, 1998; Chiarugi *et al.*, 1998). O terceiro grupo de moléculas angiogênicas corresponde aos fatores de ação indireta, cujo efeito resulta na liberação de fatores de ação direta por macrófagos, células endoteliais e células tumorais. Os mais estudados são o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e o fator de crescimento transformante-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que são capazes de induzir a angiogênese pelo aumento da expressão de FGF-2, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), VEGF e seus receptores e também interleucina-8 (Falcone *et al.*, 1993; Pintavorn & Ballermann, 1997; Giraudo *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1997). Quando a neovascularização formada já é suficiente, os fatores angiogênicos são sub-regulados ou a concentração local de inibidores da angiogênese aumenta. Como resultado, as células endoteliais se tornam quiescentes, e os vasos permanecem ou regridem, caso não sejam mais necessários.

### **2.3.1. Angiogênese tumoral**

No trabalho pioneiro de Folkman *et al.* (1971) foi estabelecido que tumores com mais de 2 mm de diâmetro necessitam de novos vasos sanguíneos para um adequado suprimento de oxigênio e nutrientes, para o crescimento das células tumorais e conseqüente disseminação metastática. O crescimento tumoral é em parte governado pela capacidade de difusão do oxigênio fornecido pelos vasos sanguíneos da região e, em resposta à hipóxia, ocorre a formação de novos vasos sanguíneos. Isto, por sua vez, leva a um crescimento tumoral rápido e exponencial que é chamado de 'angiogenic switch' (Folkman *et al.*, 1989; Hanahan & Folkman, 1996; Naumov *et al.*, 2006; Avaramides *et al.*, 2008). Em ambas as formas de angiogênese, fisiológica ou patológica, a hipóxia é um fator determinante para o início do processo. Situações de hipóxia induzem a expressão de VEGF e seu receptor, através do fator indutor de hipóxia 1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ao mesmo tempo que torna o ambiente atrativo para macrófagos. Em um tumor, o fenótipo angiogênico

pode ser adquirido pela hipóxia resultante do aumento da distância entre células tumorais em crescimento e os capilares ou da ineficiência dos vasos recém-formados em nutri-lo (Denko, 2008).

As células tumorais têm o genoma instável e conseqüentemente geram oncogenes e adquirem fenótipos variados, incluindo o fenótipo angiogênico. A mudança para um fenótipo angiogênico depende do equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos e pode resultar da produção de fatores de crescimento pelas células tumorais e/ou por moduladores negativos em tecidos com vasculatura quiescente (Pepper, 1997). As células tumorais induzem a produção de fatores angiogênicos: 1) pela aquisição do fenótipo angiogênico, 2) pela ativação de células do estroma, como fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos, 3) pela liberação de fatores angiogênicos aprisionados na matriz extracelular e 4) pela expressão de epítomos na matriz extracelular que promovem angiogênese (Norrby *et al.*, 2006).

Os produtos das células tumorais que influenciam a angiogênese são ativos não somente no tumor, mas também em tecidos distantes (Norrby *et al.*, 2006). Um exemplo deste tipo de efeito é o recrutamento de precursores endoteliais circulantes (CEPs) da medula óssea pelo VEGF secretado pelas células tumorais. CEPs são capazes de se fixar em microvasos ativados no tumor e aumentar a reação angiogênica através de sinalização parácrina (Kinnaird *et al.*, 2004) ou por funcionarem como células suporte para o desenvolvimento dos novos vasos (Ziegelhoeffer *et al.*, 2004). Além disso, estudos indicam que o processo de angiogênese tumoral não resulta somente da interação entre células tumorais parenquimatosas com células endoteliais de origem vascular ou linfática, mas que as células do estroma adjacente também desempenham um papel na neoformação vascular (Bissel & Labarge, 2005; Bissel *et al.*, 2005). Estas podem contribuir induzindo ou inibindo o desenvolvimento tumoral e fornecendo suporte para as células malignas (Sparmann & Bar-Sagi, 2004; Albini *et al.*, 2005; Karin, 2005).

A terapia anti-angiogênica é uma promissora estratégia anti-câncer e tem sido base para a identificação de moléculas angiogênicas e anti-angiogênicas (Folkman & Shing, 1992). Vários agentes anti-angiogênicos que inibem tanto fatores de crescimento angiogênicos como seus receptores já foram desenvolvidos e têm sido objeto de estudos pré-clínicos e clínicos (Papetti & Herman, 2002).

A formação de novos vasos sanguíneos é um achado comum nos melanomas cutâneos, indicando que estes tumores apresentam alta atividade angiogênica (Mihm *et al.*, 1975). Entretanto, a importância clínica e prognóstica da angiogênese tumoral na progressão e desenvolvimento de metástases em melanomas permanece controversa (Streit & Detmar, 2003). Células de melanomas humanos sintetizam *in vitro* uma variedade de fatores angiogênicos, incluindo VEGF, bFGF, IL-8, PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e PlGF (fator de crescimento placentário). O aumento da expressão de VEGF e acúmulo desta proteína no estroma tumoral podem estar associados com a transição do crescimento horizontal para crescimento vertical em melanomas (Erhard *et al.*, 1997; Marcoval *et al.*, 1997). Imunoreatividade para VEGF também já foi relacionada com espessura tumoral, embora VEGF não tenha sido considerado um fator prognóstico útil para melanomas (Bayer-Garner *et al.*, 1999; Straume & Akslen, 2001). Outros estudos mostraram que VEGF foi expresso somente em 32% dos melanomas primários, tendo expressão aumentada nos tumores metastáticos (Salven *et al.*, 1997). Embora alguns estudos demonstrem que a produção de VEGF não é tão proeminente em melanomas quanto em outros tumores epiteliais (Dvorak *et al.*, 1995), a expressão de seus receptores sugere a possibilidade de que VEGF possa também exercer efeitos autócrinos nas próprias células tumorais (Graeven *et al.*, 1999; Lacal *et al.*, 2000). A expressão de RNAs mensageiros do fator básico de crescimento fibroblástico (bFGF e FGF-2), potentes fatores angiogênicos, foi detectada em melanomas primários invasivos e metastáticos, enquanto melanócitos de nevos benignos não os expressaram (Reed *et al.*, 1994).

## **2.4. Linfangiogênese**

O sistema linfático é um importante componente da circulação e tem como função primária manter o equilíbrio osmótico e hidrostático entre o espaço intersticial e os capilares sanguíneos (Swartz *et al.*, 2001). Além do mais, os linfáticos têm grande importância no sistema imunológico, pois participam do transporte de células inflamatórias e de antígenos. Os vasos linfáticos são distintos dos sanguíneos tanto na função como na estrutura (Witte *et al.*, 2001). O citoplasma das células endoteliais linfáticas é escasso e, por esse motivo, esses vasos apresentam paredes mais finas com a luz mais larga e irregular, geralmente colapsada. Suas junções endoteliais são mais frouxas do que a dos vasos sanguíneos, o que confere uma maior permeabilidade a suas paredes. A lâmina basal dos vasos linfáticos é escassa e, ao contrário dos vasos sanguíneos, não está associada a pericitos. Os linfáticos estão ligados a matriz extracelular por fibras reticulares, que, na presença de um aumento de pressão do fluido intersticial, se esticam aumentando a luz e fazendo com que as células endoteliais se afastem abrindo canais intercelulares, que promovem a entrada do fluido para o interior do vaso (Witte *et al.*, 1997; Skobe & Detmar, 2000; Witte *et al.*, 2001; Stacker *et al.*, 2002).

A linfangiogênese é o processo pelo qual os vasos linfáticos são formados. Em um tecido adulto normal, o processo de linfangiogênese é mínimo (Björndahl *et al.*, 2005), no entanto em certas condições patológicas como cicatrização de feridas, o crescimento tumoral e geração de metástases dependem tanto da angiogênese como da linfangiogênese (Carmeliet & Jain *et al.* 2000; Skobe *et al.*, 2001a e b; Stacker *et al.*, 2002; Leiter *et al.*, 2004; Hirakawa *et al.*, 2007).

### **2.4.1. Linfangiogênese tumoral**

Em tumores, os linfáticos também podem atuar como barreira contra a disseminação de células neoplásicas, drenando-as para os linfonodos e evitando que estas caiam diretamente na corrente sanguínea. Porém, muitas vezes ao invés de serem eliminadas pelo sistema imunológico, as células neoplásicas

conseguem proliferar nos linfonodos ou mesmo atingir outros órgãos por disseminação linfática, formando as metástases que representam a maior causa de mortes relacionadas ao câncer. Em muitas neoplasias malignas como as de mama, o carcinoma espinocelular bucal, as de colo de útero, próstata, pulmão e melanoma, a principal via de metástase é a linfática, inicialmente para linfonodos regionais (Fidler, 2001). A presença de células neoplásicas em linfonodos regionais é um fator importante no estadiamento destes tumores e planejamento do tratamento cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico (Taipale *et al.*, 1999; Fidler, 2001).

Interações entre células tumorais e vasos linfáticos são de primordial importância para a progressão tumoral, entretanto, os mecanismos moleculares são pobremente estudados. Dradas *et al.* (2001) verificaram que ocorre maior formação de vasos linfáticos dentro e ao redor de melanomas metastáticos do que nos tumores primários, o que ocorre devido a expressão de vários fatores angiogênicos, dentre os quais o VEGF, FGF e IL-8, que estão aumentados neste tipo de neoplasia (Streit & Detmar, 2003). A expressão de VEGF-C ou VEGF-D foi detectada em neoplasias malignas humanas, como melanoma, adenocarcinomas de pulmão, mama, cólon, carcinomas de cabeça e pescoço e carcinomas gástricos (revisado em Stacker *et al.*, 2002). Esses fatores são responsáveis pela linfangiogênese ou hiperplasia linfática intra e peritumoral, invasão e metástases linfáticas (Isaka *et al.*, 2004; Da *et al.*, 2008). A expressão de VEGFR-3 é também um fator importante na determinação da resposta linfangiogênica, pois já foi mostrada a co-expressão de VEGF-C/D e VEGFR-3 em melanomas (Achen *et al.*, 2001) e carcinomas de pulmão (Kajita *et al.*, 2001). Também foram realizados estudos comparativos da expressão destes fatores com dados clínicos-patológicos em câncer de tireóide, estômago, cólon e pulmão, existindo associação com a capacidade de emissão de metástases pelo tumor primário, envolvimento linfonodal, esvaziamento linfático, metástases secundárias e sobrevida livre de doença (Bunone *et al.*, 1999; Yonemura *et al.*, 1999; Akagi *et al.*, 2000; Kajita, *et al.*, 2001). Por exemplo, níveis aumentados de mRNA de VEGF-C, detectados por

RT-PCR, estão relacionados com metástases para linfonodos e menor sobrevida para pacientes com adenocarcinoma de pulmão ou mesotelioma (Niki *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 1999). Há também uma correlação inversa entre a expressão imunohistoquímica de VEGF-C e sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de mama (Kinoshita *et al.*, 2001). Schietroma *et al.* (2003) avaliaram a expressão de VEGF-C em cultura de células de melanoma humano cutâneo e de linfonodos metastáticos por RT-PCR, northern blot, imunofluorescência e imunohistoquímica e sugeriram que a expressão de VEGF-C melanoma cutâneo primário poderia prever a disseminação metastática para linfonodos.

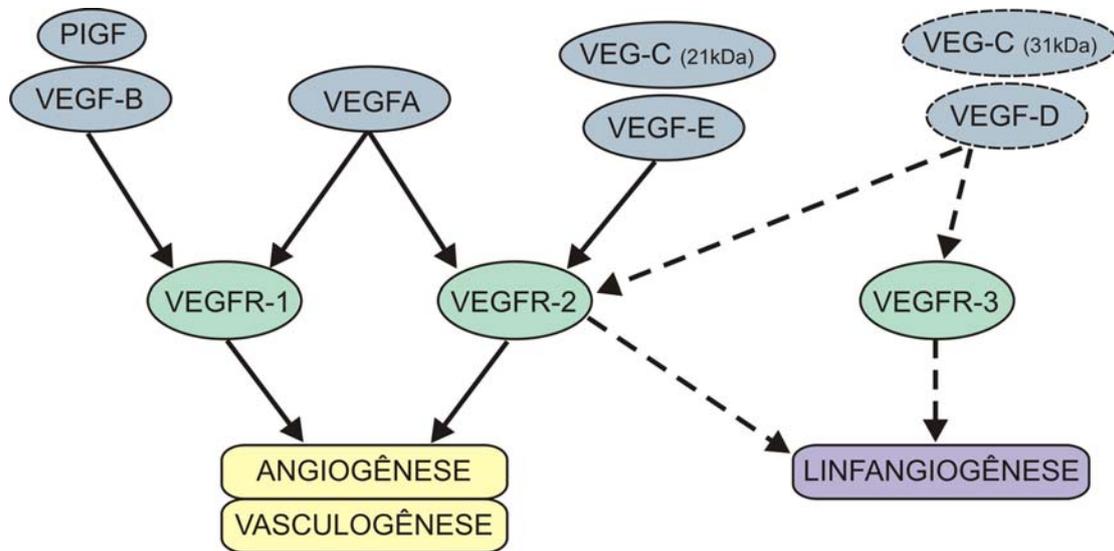
## **2.5. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)**

A regulação do crescimento de vasos sanguíneos e linfáticos depende da produção de diversos fatores de crescimento. Os membros da família VEGF são considerados elementos importantes no processo de angiogênese e linfangiogênese, pois são mitógenos específicos para células endoteliais, atuando em condições fisiológicas ou patológicas, como o desenvolvimento embrionário (Roy *et al.*, 2006), cicatrização de feridas (Bates *et al.*, 2003; Falanga *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2006), artrite reumatóide (Hirorata & Sakakibara, 1999), neovascularização ocular (Witmer *et al.*, 2003; Franket *et al.*, 2004) e progressão tumoral (Carmeliet & Jain, 2000; Skobe *et al.*, 2001a e b; Dradas *et al.*, 2003; Hirakawa *et al.*, 2007).

A família VEGF é composta por 7 membros (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e PlGF) com diferentes propriedades biológicas. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-E, VEGF-F e PlGF têm grande importância no processo de angiogênese e vasculogênese, enquanto que o VEGF-C e VEGF-D estão ligados ao processo de linfangiogênese e metástase linfática (Skobe *et al.*, 2001a; Stacker *et al.*, 2001; Padera *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2002; Karkkainen, 2004). Através de *splicing* alternativo o VEGF-A pode apresentar 6 isoformas: VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 e VEGF206 (Bates *et al.*, 2003). O VEGF165 pode ser clivado em sua extremidade carboxi-

terminal e gerar outros dois fragmentos com atividades biológicas: VEGF110 ou VEGF113 (Kowanetz & Ferrara, 2006; Roy *et al.*, 2006). Esses fatores são produzidos e secretados por células do estroma e seus receptores (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3), que possuem atividade de tirosina-quinase e são expressos na superfície de células endoteliais. VEGF-A, VEGF-B e PlGF são capazes de se ligar em VEGFR-1, enquanto que o VEGFR-2 é ativado primariamente por VEGF-A, VEGF-E, VEGF-C em sua forma clivada com 21kDa e por VEGF-D e o VEGFR-3 induz a linfangiogênese através da ligação com o VEGF-C (forma clivada com 31kDa) ou VEGF-D (Figura 1). VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos em células endoteliais vasculares e células tumorais. A expressão VEGFR-3 é aparentemente restrita células endoteliais linfáticas (Kowanetz & Ferrara, 2006). A expressão do VEGF-A é também estimulada por certas citocinas e fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , PDGF, TGF- $\alpha$ ) e pela hipóxia tecidual, mecanismo relativamente bem compreendido (Dvorak *et al.*, 1995). Além disso, um grande número de co-receptores como proteoglicanos, heparan sulfato e neuropilina tem sido implicados em promover a ativação dos VEGFRs (revisado em Takahashi & Shibuya, 2005).

VEGF-C estimula a migração de células endoteliais aumenta a permeabilidade vascular e a proliferação celular. A expressão de VEGF-C não parece ser regulada por hipóxia. VEGF-D ou FIGF (*c-fos-induced growth factor*) possui 61% de homologia com o VEGF-C, e se liga, em camundongos, exclusivamente em VEGFR-3. Pouco se sabe sobre o VEGF-D em condições fisiológicas, porém seus RNAs mensageiros já foram observados em melanócitos, fibroblastos, no mesênquima pulmonar e na parede vascular. Em adultos, VEGF-C e VEGF-D regulam a linfangiogênese em processos inflamatórios, afetam a dinâmica de fluidos nos vasos linfáticos, a formação de válvulas vasculares e recrutam células de músculo liso para o desenvolvimento de vasos linfáticos coletores, além de estarem relacionados a progressão tumoral e formação de metástases (revisado em Jussila *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Diagrama mostrando as formas de ativação dos receptores tirosina-quinase VEGFR pelos fatores de crescimento da família VEGF.

## 2.6. Fator indutor de hipóxia (HIF-1)

O fator indutor de hipóxia (HIF-1) é um heterodímero composto por duas subunidades: HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\alpha$  é a subunidade regulada por hipóxia e que determina a atividade de HIF-1 (Wang *et al.*, 1995). A expressão de VEGF pode ser induzida pela exposição das células tumorais à hipóxia ou a fatores de crescimento, em ambos os casos, esta ocorre em parte pelo aumento da transcrição do gene VEGF que é regulada por HIF-1 $\alpha$ . Este fator tem um papel importante na progressão tumoral por regular a angiogênese, sobrevivência celular e resistência a drogas, sendo recentemente relacionado com linfangiogênese tumoral. A hipóxia aumenta a concentração intracelular da proteína HIF-1 $\alpha$  que por sua vez aumenta a transcrição de VEGF, o qual difunde-se através dos tecidos e atua seletivamente sobre as células endoteliais, controlando a produção de proteases, migração, proliferação e diferenciação (Carmeliet *et al.*, 1998). Quando novos vasos se formam, a concentração de oxigênio é reestabelecida e a atividade de HIF-1 $\alpha$  diminui, o que bloqueia a

produção de VEGF. Em um tecido normal, bem oxigenado, a degradação de HIF-1 $\alpha$  depende da sua ubiquitinação pelo produto do gene VHL (Iliopoulos *et al.*, 1996). Mutações neste gene podem levar ao aumento na produção de HIF-1 $\alpha$  e produção excessiva de VEGF, resultando no desenvolvimento de hemangioblastomas (síndrome de Von Hippel-Lindau) (Maxwell *et al.*, 1999).

## **2.7. Melanoma**

Melanomas são neoplasias malignas de etiologia multifatorial, originárias a partir da transformação maligna de melanócitos. Durante o primeiro trimestre do desenvolvimento embrionário, os melanoblastos (células precursoras dos melanócitos) migram da crista neural para a camada basal da epiderme onde interdigitam-se com queratinócitos das camadas basais e suprabasais, para os quais a melanina é transferida através de seus prolongamentos dendríticos (revisado por Sturn *et al.*, 2001). A melanina é um pigmento fotoprotetor e fotosensível, produzido em vesículas especializadas (melanossomas) em resposta a radiação UV a partir de sucessivas reações de oxidação da tirosina. Este pigmento atua como filtro endógeno contra os raios ultravioletas da luz solar (Meyskens *et al.*, 2001; Maddodi & Setaluri, 2007), que podem atingir os ácidos nucléicos de células da camada basal e causar mutações (revisado em Tran *et al.*, 2008). Fatores associados à radiação UV, tais como grau de pigmentação da pele, índice de exposição à radiação ultravioleta, imunossupressão, estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição da produção de antioxidantes e efeitos diretos ao DNA, como a formação de dímeros de pirimidina, estão associados à etiologia dos melanomas (Tran *et al.*, 2008). Por outro lado, existem melanomas não associados aos raios UV, os quais têm histórico familiar ou estão relacionados com nevos pré-existentes (revisado por Li *et al.*, 2006). O acúmulo de mutações em melanócitos normais culmina em sua transformação maligna e alterações em genes supressores de tumor ou do sistema de reparo do DNA já foram associadas à progressão tumoral (Hussein, 2004). Dentre os genes ligados à progressão do melanoma podemos citar aqueles que codificam

proteínas controladoras do ciclo celular, como p16 (CDKN2A), localizado no cromossomo 9p21 e responsável pela expressão das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e p14<sup>ARF</sup> (Walker *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 2003). Outra alteração associada à etiologia do melanoma ocorre no gene CCND1, localizado no cromossomo 11q13 e responsável pela expressão da ciclina D1, que atua regulando positivamente o ciclo celular (Utikal *et al.*, 2005). Mutações nos genes que codificam as proteínas da família *ras* e as serina/treonina quinases *raf*, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF/SF) e seu receptor c-MET, assim como as proteínas supressoras tumorais PTEN, p53, p27<sup>Kip1</sup> e p21, também já foram descritas em melanomas (Chin, 2003; Chudnovsky *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

O melanoma representa cerca de 4% das neoplasias malignas de pele, sendo o terceiro tipo de câncer de pele mais comum, com incidência mundial anual de 24,6 casos para cada cem mil homens e 15,6 casos para cada cem mil mulheres. Entre 2001 e 2005 nos EUA, o índice de mortalidade foi de 2,7 mortes para cada 100.000 pessoas (*National Cancer Institute- www.cancer.gov*). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2006), aproximadamente 79.000 homens e 81.000 mulheres foram diagnosticados com melanoma no mundo durante o ano de 2002, neste mesmo ano, 22.000 homens e 19.000 mulheres morreram devido a essa neoplasia no mundo. Dados das *Estimativas de Incidência e Mortalidade do Instituto Nacional de Câncer (INCA)* previram para o ano de 2008, 2.950 casos novos desta neoplasia em homens e 2970 casos novos em mulheres. Nos Estados Unidos, esta foi a neoplasia maligna com aumento mais expressivo, tendo sua incidência quase triplicada nas últimas quatro décadas. A letalidade do melanoma é elevada, porém felizmente sua incidência é baixa. O melanoma é um grave problema de saúde, não apenas pela sua incidência ou por afetar adultos jovens, mais pelo seu alto potencial metastático e por ser pouco sensível à radioterapia e aos quimioterápicos atualmente conhecidos (revisado por Li *et al.*, 2006). Nos países desenvolvidos, a sobrevida média para doença não metastática em cinco anos é de 73%, enquanto que para os países em desenvolvimento a sobrevida média em 5 anos é de 56%. A doença

metastática é na maioria das vezes fatal (Rigel *et al.*, 1996; Brochez & Naeyaert, 2000; Leiter *et al.*, 2004; Perlis & Herlyn, 2004), sendo a sobrevida média de 8,1 meses e em 5 anos de apenas 2% (Lee *et al.*, 2000; Innocenzi *et al.*, 2003). Os sítios mais freqüentes de metástases são o fígado, pulmões, cérebro, ossos, ovário, estômago, pâncreas e intestino delgado (Hawes *et al.*, 2001; Rodolfo *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 2004; Atallah & Flaherty, 2005; Katz *et al.*, 2005; McWilliams *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Belagyi *et al.*, 2006). Cerca de 91,2% dos casos de melanoma afetam a pele e 1,3% afetam as mucosas, dos quais 55,4% ocorrem na região de cabeça e pescoço. Os melanomas primários da cavidade oral são raros, pois estima-se que eles representem 1-2% de todas as neoplasias malignas orais e aproximadamente 0,2 a 8% de todos os melanomas (revisado por Pour, 2008).

A cirurgia é o tratamento mais indicado para o melanoma em fase inicial, sendo a quimioterapia e a radioterapia também utilizadas, dependendo do estágio da doença. No estágio inicial, que se caracteriza por um crescimento radial, o melanoma é tratado por excisão cirúrgica e tem o índice de Breslow (distância em milímetros desde a camada nucleada mais superficial até o nível mais profundo de invasão) e de Clark (correlaciona o nível anatômico de invasão associado ao índice mitótico) como fatores prognósticos (Chin *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 2003).

### ***3. OBJETIVOS***

---

---

#### **3.1. Objetivo geral**

Verificar o efeito da inibição de FASN com orlistat na linfangiogênese em modelos murinos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

3.2.1. Verificar o efeito da inibição de FASN com orlistat na linfangiogênese provocada por feridas cirúrgicas na cauda de camundongos Balb-C através de microlinfangiografia fluorescente.

3.2.2. Avaliar o efeito da inibição de FASN com orlistat na linfangiogênese provocada pela injeção de células B16-F10 em orelhas de camundongos C57BL6, através de microlinfangiografia fluorescente.

3.2.3. Estudar as consequências da inibição da atividade de FASN com orlistat sobre a expressão das proteínas FASN e VEGFR-3 nos tumores primários e linfonodos metastáticos dos camundongos C57Bl6, através de reações de *western blot*.

3.2.4. Estudar a expressão de VEGF-C e -D nos tumores primários e linfonodos metastáticos através de RT-PCR semi-quantitativo.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---

### **4.1. Cultura de células**

A linhagem B16-F10 (ATCC), derivada de melanoma de camundongo, foi cultivada em frascos plásticos de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, E.U.A) suplementado com 10% de FBS (Cultilab, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen, E.U.A.) na diluição de 1:100, a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

As células utilizadas nos experimentos foram subcultivadas quando atingiam uma confluência de 60 a 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 0,5 ml ou 2 ml de tripsina a 2%, para frascos de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Após um período que variou de 1 a 3 minutos, as células ficavam separadas do assoalho do frasco de cultura (determinado por observação em microscópio de contraste de fase), sendo então a ação da tripsina interrompida pela adição de 5 ml (frasco de 25 cm<sup>2</sup>) ou 10 ml (frasco de 75 cm<sup>2</sup>) 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 800xg 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 re-plaqueadas 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 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, as células foram transferidas para tubos de 15 ml contendo 10

ml de meio e centrifugadas. Os “pellets” foram então ressuspendidos 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**

Para a aplicação nos camundongos, o composto ativo do orlistat (Xenical<sup>®</sup>, Roche, Suíça) foi extraído de acordo com Knowles *et al.* (2004), dissolvendo-se o conteúdo de uma cápsula em 1ml de etanol a 33% em PBS, seguido de agitação a cada 10 minutos por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, a solução foi centrifugada a 16.000xg por 5 minutos e o sobrenadante coletado e mantido a -80°C até o momento do uso.

#### **4.3. Modelos animais para estudo da linfangiogênese**

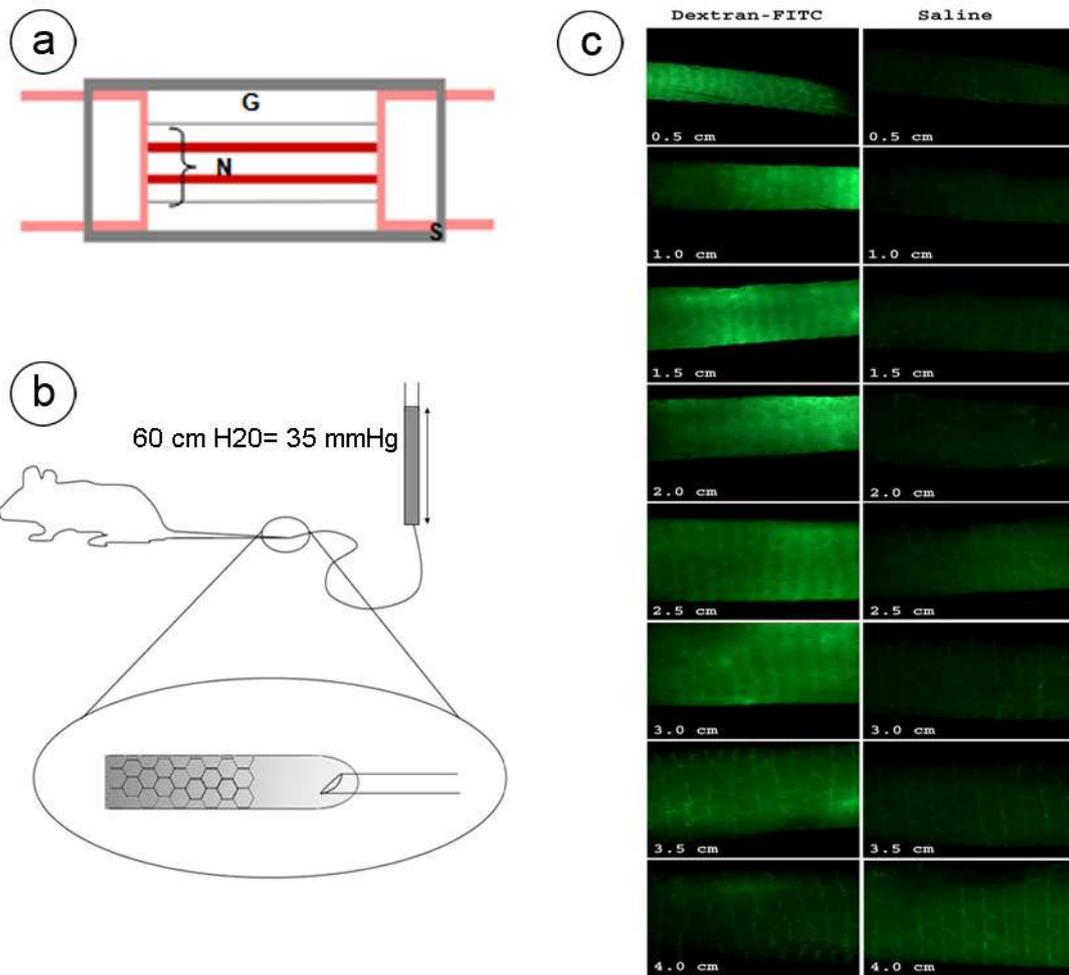
Os 137 camundongos da linhagem Balb-C e os 66 camundongos da linhagem C57Bl6, todos machos, com 5 a 8 semanas de vida, foram obtidos junto ao CEMIB-UNICAMP, mantidos em gaiolas apropriadas, alimentados com ração comercial Labina<sup>®</sup> (Purina, Brasil) e providos de água *ad libitum*. As gaiolas ficaram em sala climatizada, com controle automático de iluminação, alternando períodos claros e escuros a cada 12 horas. Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (n° 1333-1, CEEA-IB-UNICAMP, anexo I). Para todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com injeções subcutâneas de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/ Kg). Os animais dos grupos tratados receberam 60µl da solução de orlistat (o que corresponde a 240mg/kg/dia – via i.p.). Os animais dos grupos controle receberam injeções somente do veículo (60 µl de uma solução contendo 33% etanol em PBS). Para a

microlinfangiografia fluorescente foram utilizadas as caudas de 20 camundongos balb-C, as orelhas de 89 camundongos balb-C e também de 29 camundongos C57Bl6. Para análise histológica, utilizamos as orelhas de 28 camundongos Balb-C e de 37 camundongos C57Bl6. Os tumores primários e os linfonodos metastáticos dos 66 camundongos C57Bl6 foram medidos e os volumes calculados segundo a fórmula  $\text{Volume} = \text{largura}^2 \text{ (mm)} \times \text{comprimento (mm)} / 2$  (Perera *et al.*, 2008).

#### **4.3.1. Avaliação da linfangiogênese na cauda de camundongos Balb-C por microlinfangiografia fluorescente**

O modelo inicialmente utilizado nesta pesquisa foi descrito por Boardman *et al.* (2003) para o estudo de linfangiogênese no processo de reparo de feridas. Em nosso trabalho, utilizamos 20 camundongos Balb-C que foram anestesiados e submetidos ao procedimento cirúrgico, que consistiu na cuidadosa realização de uma ferida circunferencial com 2 mm de largura na derme da cauda preservando os tendões, vasos sanguíneos maiores e tecidos muscular e ósseo subjacentes (Figura 1a). Esta ferida cutânea em forma de anel na pele da cauda interrompe os vasos linfáticos, localizados em plano mais superficial do que os grandes vasos, impedindo o retorno do líquido tecidual a partir da porção distal da cauda. A ferida cirúrgica foi então coberta por um gel de colágeno tipo I com pH 7.3 (Bell *et al.*, 1978) e protegida por um tubo de silicone permeável (Silastic Laboratory Tubing, Dow Corning) fixado à pele da cauda. Segundo Boardman *et al.* (2003), o líquido intersticial atravessa o gel de colágeno e atinge a porção proximal da ferida em 10 dias, o que estimula a neoformação dos vasos linfáticos, cuja rede é discretamente observada em 25 dias e se restabelece por completo em 60 dias. Para avaliarmos o efeito do orlistat na linfangiogênese, os animais foram tratados com orlistat 10 dias após a cirurgia e o grupo controle apenas com o veículo. O tratamento prosseguiu até o 45º dia, quando os animais foram novamente anestesiados e uma avaliação dos vasos linfáticos funcionais presentes na área da ferida cirúrgica foi feita pela técnica de microlinfangiografia fluorescente. Para

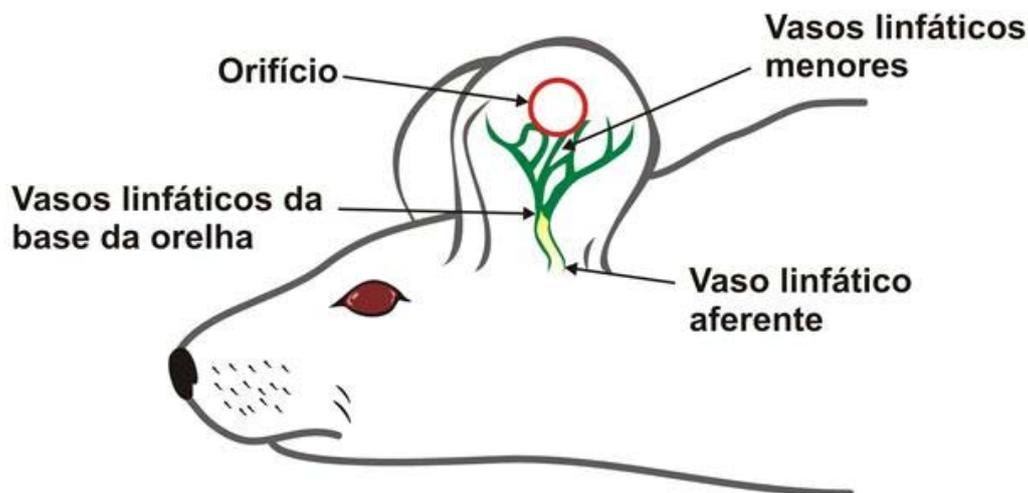
isto, 20µl da solução de dextrano a 1% marcado com FITC (Lysine-fixable FITC-Dextran, 2000 kDa, Invitrogen) foram injetados intradermicamente na ponta da cauda dos animais, a cerca de 30 mm do local da ferida cirúrgica, sob uma pressão de 35 mmHg proporcionada por uma coluna de água de 60 cm conectada a uma mangueira de infusão e agulha 30G, por um período de aproximadamente 1 hora (Figura 1b). Após a infusão, os animais foram sacrificados, as caudas removidas, observadas e fotografadas em microscópio equipado com epifluorescência (Leica DMR, Leica Microsystems, Alemanha).



**Figura 1:** a) Esquema da ferida cirúrgica em forma de anel com 2 mm de largura, coberta por um gel de colágeno (G) e protegida por um tubo de silicone permeável (S), interrompendo a rede linfática superficial e preservando os vasos sanguíneos maiores, tendões, músculos e osso (N= núcleo da cauda). b) Dextrano marcado com FITC foi injetado intradermicamente na ponta da cauda sob uma pressão de 35 mmHg proporcionada por uma coluna de água de 60 cm conectada a uma mangueira de infusão e agulha 30G. Desta forma, os vasos linfáticos presentes na cauda e no local da ferida cirúrgica se tornam fluorescentes e podem ser observados em microscópio de epifluorescência. c) Organização dos vasos linfáticos na cauda de camundongos em formato hexagonal, observada na microlinfangiografia fluorescente, em comparação com um controle no qual foi injetado apenas soro fisiológico. Após a infusão com dextrano marcado com FITC ou solução salina, as caudas foram removidas e avaliadas em microscópio de fluorescência. Os números no canto inferior esquerdo de cada fotografia mostram a distância da extremidade distal da cauda (Aumento original: 25 X).

#### **4.3.2. Avaliação da linfangiogênese em orelhas de camundongos Balb-C por microlinfangiografia fluorescente**

Para induzir reação inflamatória com conseqüente neoformação de vasos linfáticos, utilizamos o modelo animal descrito por Cho *et al.* (2006) para o estudo de linfangiogênese no processo de reparo de feridas em camundongos diabéticos (Figura 2). Foram utilizados 4 grupos, totalizando 117 camundongos, que depois de anestesiados tiveram as orelhas perfuradas com perfurador de Ainsworth (Golgran, Brasil), que produz orifícios regulares com aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Foram evitadas as áreas onde vasos sanguíneos maiores estavam presentes. O tratamento com orlistat ou com seu veículo foi feito por 25 dias a partir do procedimento cirúrgico. Após este período, os camundongos foram novamente anestesiados e a rede linfática das orelhas de 89 camundongos (44 controle e 45 tratados) foi avaliada por microlinfangiografia fluorescente (Tammela *et al.*, 2007; Hoshida *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 2006; He *et al.*, 2005; He *et al.*, 2004). Para isto, 2 µl da solução de dextrano a 0,1% marcado com FITC foram injetados intradermicamente de cada lado do orifício com o auxílio de uma microseringa (Hamilton, E.U.A.). Após 15 minutos, os animais foram sacrificados, as orelhas removidas, observadas e fotografadas em um microscópio equipado com epifluorescência. Após a captura das imagens, um círculo com 5 cm de diâmetro foi feito sobre a imagem, demarcando a área com maior quantidade de vasos linfáticos ramificados, o comprimento dos vasos desta área foi estimado com o auxílio do programa Scion Image (Scion Corporation, E.U.A.).

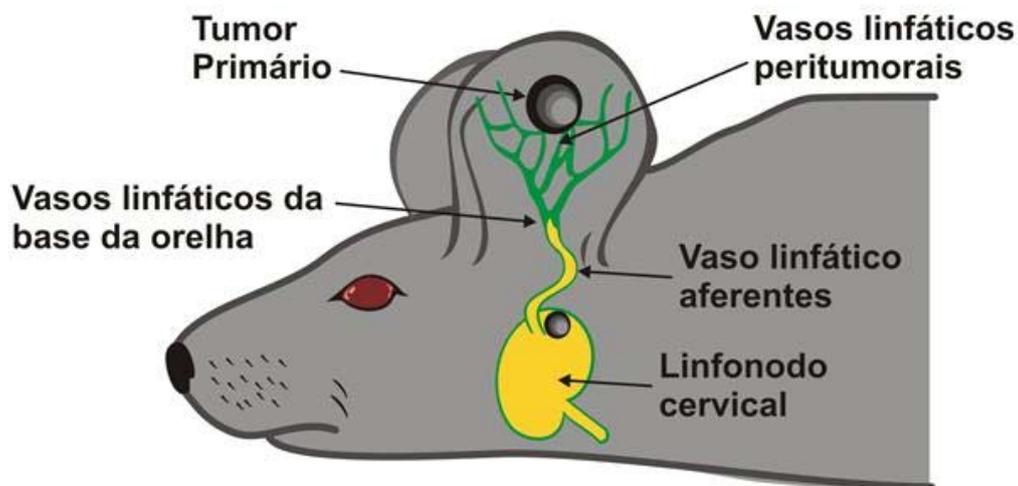


**Figura 2:** Esquema mostrando o local da perfuração realizada nas orelhas direita e esquerda dos camundongos Balb-C e a sua relação com os vasos linfáticos menores e vasos linfáticos da base da orelha, observados após injeção intradérmica da solução de dextrano marcado com FITC nas margens direita e esquerda do orifício. Quinze minutos após a injeção, os camundongos foram sacrificados, as orelhas removidas e fotografadas em microscópio de epifluorescência.

#### **4.3.3. Avaliação dos vasos linfáticos peritumorais por microlinfangiografia fluorescente**

Para avaliarmos a linfangiogênese induzida por células derivadas de melanoma, utilizamos o modelo animal descrito por Hoshida *et al.* (2006), no qual tumores primários foram provocados nas orelhas de camundongos C57Bl6 ou *nude* pela injeção de células derivadas de melanoma (B16-F10) ou de fibrosarcoma (T241). Neste modelo, células tumorais podem se desprender do tumor primário, atingir os vasos linfáticos peritumorais ou da base de orelha e, após percorrerem os vasos linfáticos aferentes, proliferar em linfonodos da região cervical formando metástases (Figura 3). No presente trabalho, foram utilizados 4 grupos, totalizando 86 camundongos C57Bl6, que receberam injeções

intradérmicas contendo  $10^5$  células B16-F10 suspensas em meio de cultura RPMI 1640 nas duas orelhas, com o auxílio de uma microseringa. No mesmo dia do implante celular foi iniciado o tratamento com a solução de orlistat ou seu veículo. Após 20 dias de tratamento, 29 animais foram sacrificados (14 controle e 15 tratados) e os vasos linfáticos funcionais presentes nas orelhas avaliados por microlinfangiografia fluorescente, pela injeção intradérmica de 2 $\mu$ l da solução de dextrano marcado com FITC a 0,1% na região peritumoral. Após 15 minutos, os animais foram sacrificados, os tumores primários medidos, as orelhas removidas, observadas e fotografadas em microscópio equipado com epifluorescência. Após a captura das imagens, um círculo com 5 cm de diâmetro foi feito sobre a imagem, demarcando a área com maior quantidade de vasos linfáticos ramificados, o comprimento dos vasos desta área foi estimado com o auxílio do programa *Scion Image*. Os tumores primários das orelhas direita ou esquerda de 57 camundongos e os linfonodos cervicais metastáticos dos 86 camundongos que receberam o implante das células B16-F10 foram medidos e congelados para extração de RNA total e de proteínas. Fragmentos destes tecidos foram fixados em formol 10% para processamento histológico. O volume de cada um dos tumores primários e dos linfonodos metastáticos foi calculado de acordo com a fórmula:  $\text{Volume} = \text{largura}^2 \text{ (mm)} \times \text{comprimento (mm)} / 2$  (Perera *et al.*, 2008).



**Figura 3:** Os tumores primários nas orelhas dos camundongos C57Bl/6 foram provocados pela injeção de  $10^5$  células B16-F10. Neste modelo, as células conseguem atingir a circulação linfática e proliferar nos linfonodos cervicais formando metástases regionais. A rede linfática e os linfonodos foram avaliados pela injeção peritumoral da solução de dextrano marcado com FITC a 0,1% em microscópio de epifluorescência.

#### 4.4. Preparação do material para análise microscópica

Para análise microscópica, foram removidas as orelhas direita e esquerda de 28 camundongos Balb-C e de 37 camundongos C57Bl/6 com tumores primários. Além disto, foram coletados os linfonodos metastáticos de ambos os lados, os pulmões, coração, fígado, baço e cérebro dos 66 camundongos C57Bl/6 que receberam implante de células tumorais. Os tecidos foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina e os cortes histológicos obtidos ( $5\mu\text{m}$ ) corados com hematoxilina e eosina para análise microscópica de possíveis focos de metástase à distância.

#### **4.5. Preparação dos extratos protéicos e reações de western blotting**

Os tumores e linfonodos congelados de 19 camundongos C57Bl6 tratados com orlistat e de 18 camundongos do grupo controle que apresentaram volume maior que 30 mm<sup>3</sup> foram selecionados para extração protéica em um tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton X-100, 20mM de Tris-HCl pH 8,0, 137mM de NaCl, 10% de glicerol, 2mM de EDTA, 1mM de NaF e 1mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Os inibidores de protease PMSF (1mM), leupeptina (1µg/ml), inibidor de tripsina ("soybean trypsin inhibitor", 10µg/ml) e aprotinina (1µg/ml) foram adicionados ao tampão de lise imediatamente antes do uso. Os tecidos, ainda congelados, foram seccionados em uma placa de Petri colocada sobre gelo seco, uma parte de cada um dos tumores e linfonodos foi transferida para um homogeneizador manual de vidro contendo tampão de lise em proporção de aproximadamente 3,5g/ml, sendo a outra parte reservada para a extração de RNA total. A solução protéica foi mantida no gelo por 30 minutos, sendo homogeneizada a cada 10 minutos. Depois deste período, foi realizada centrifugação a 12.000xg por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados, imediatamente congelados em gelo seco e transferidos para freezer -80°C, onde foram mantidos até o momento do uso. Alíquotas de 5 µl de cada extrato protéico foram separadas para espectrofotometria. A concentração de proteína total dos extratos protéicos foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se o reagente de Bradford (Sigma, E.U.A.) e um espectrofotômetro Spectronic Genesys 2 ajustado para 595nm.

Quantidades iguais de proteínas de cada extrato celular (36 ou 50 µg) foram misturadas com um tampão de amostra redutor concentrado quatro vezes (8% de SDS, 0,25M de Tris-HCl pH 6,8, 30% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol), contendo 20% do volume total de DL-Ditiotreitol (DTT, Sigma, E.U.A.), fervidas por 5 minutos e separadas eletroforéticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 8%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Schuell, E.U.A.) e coradas com "Ponceau S" (Sigma, E.U.A.) para verificar a eficácia da transferência. Após bloqueio por 16h a

4°C em solução a 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20mM de Tris-HCl pH 7,6, 150mM de NaCl e 1% de Tween 20 (TBST), as membranas foram incubadas com anticorpos primários anti-FASN (1:3.000, Transduction Laboratories, E.U.A), anti-VEGFR-3 (1:600, BD Biosciences, E.U.A.) ou anti- $\beta$ -actina (1:40.000, clone AC-15, Sigma, E.U.A). Os anticorpos contra a proteína de citoesqueleto  $\beta$ -actina foram usados como controle da quantidade da proteína aplicada em cada canaleta. Depois de lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, as reações foram reveladas através de quimioluminescência utilizando-se o kit de detecção ECL (Western Blotting Analysis System, Amersham Pharmacia Biotech, E.U.A.) e expostas a filmes ultra-sensíveis (Hyperfilm Ultra Detection, Amersham).

#### **4.6. Purificação de RNA e RT-PCR semi-quantitativo**

O RNA total foi purificado de cada uma das metades dos tumores e linfonodos usando o reagente Trizol (Invitrogen). Antes das reações de RT, todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1U de DNase I (Amplification Grade, Invitrogen) por 10 minutos a temperatura ambiente, para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. Para a síntese de cDNA, 1 $\mu$ g de RNA total foi reversamente transcrito em uma reação com volume final de 21 $\mu$ l, contendo 0,5mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40U de inibidor de RNase, 50U da enzima Superscrit II RT (Invitrogen), 0,5 $\mu$ g de "primers" oligo-dT (Invitrogen) e tampão 1X (contendo 1,5mM MgCl<sub>2</sub>). As reações foram realizadas a 42°C por 50 minutos, seguidas de incubação a 70°C por 15 minutos. Reações sem a enzima RT foram usadas como controles negativos. Para a amplificação específica dos cDNAs através de PCR, foram utilizados "primers" específicos para VEGF-C (sense: CAGCCACCCCTCAATACC; anti-sense: CATCTGTAGACGGACACAC), VEGF-D (sense: AGACATGCGTAGAAGTCGC; anti-sense: TGGGCAAGCACTTACAACC) e  $\beta$ -actina (sense: CATCCTCACCCCTGAAGTACC anti-sense: GGTGAGGATCTTCATGAGGT),

delineados com auxílio do programa “Amplify 1.2” (Universidade de Wiscosin, Madison, E.U.A) e seqüências dos respectivos RNAs mensageiros provenientes do “Gene Bank” (NCBI- “National Center for Biotechnology Information” – NIH, E.U.A.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para garantir que a análise da amplificação fosse feita na fase exponencial, foi utilizado método semi-quantitativo, no qual várias reações de PCR idênticas foram preparadas e paralizadas em diferentes ciclos, a partir dos quais foi determinado ciclo que melhor representa a fase exponencial da reação de PCR. Os transcritos para VEGF-C, VEGF-D e  $\beta$ -actina foram amplificados em reações de 50 $\mu$ l contendo 2 $\mu$ l de cada cDNA, 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 0,2 mM de cada “primer”. As condições do PCR foram: 95°C por 5 minutos, 35 ou 37 ciclos de 95°C por 45 seg, 55°C por 45 seg, 72°C por 45 seg e extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos foram separados em géis de agarose a 1,8% corados com brometo de etídeo. As bandas correspondentes ao VEGF-C, VEGF-D e  $\beta$ -actina foram analisadas por densitometria, sendo os resultados normalizados pela divisão dos valores obtidos para os VEGFs pelos valores de  $\beta$ -actina.

## ***5. RESULTADOS***

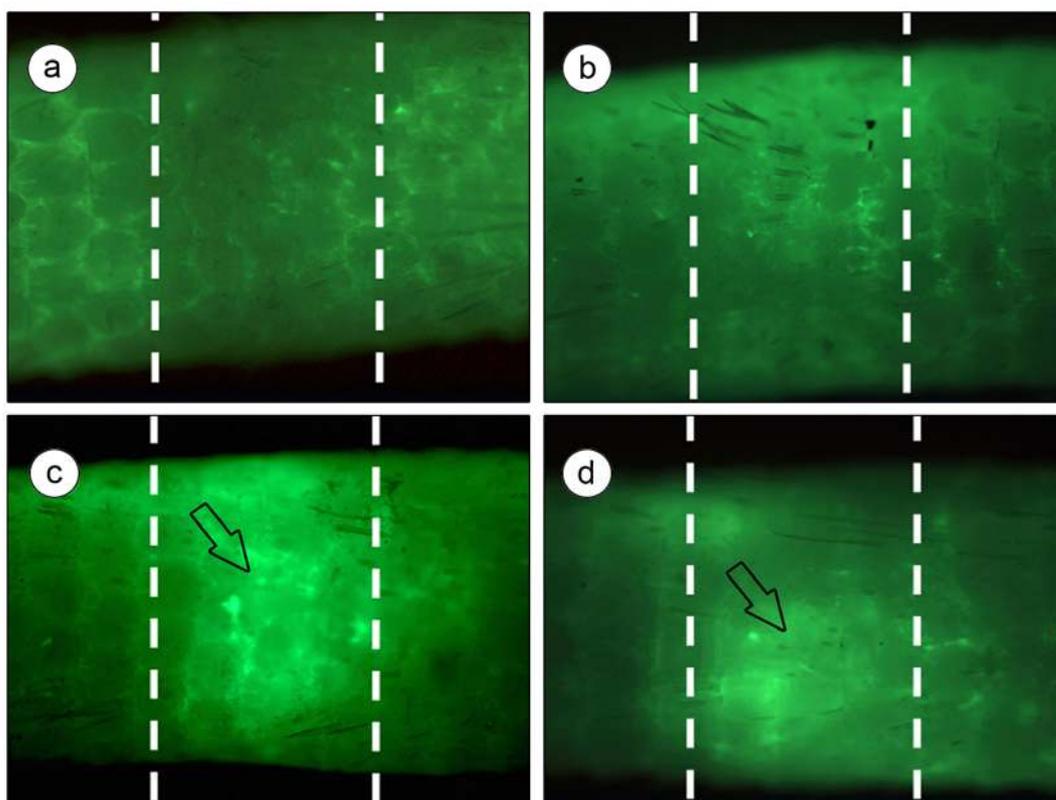
---

---

### **5.1. Avaliação da linfangiogênese na cauda de camundongos Balb-C por microlinfangiografia fluorescente**

A padronização deste experimento foi muito difícil e delicada, pois durante as cirurgias ocorreram com alguma frequência lesões nos vasos sanguíneos subjacentes, causando necrose da porção distal da cauda. Embora todos os cuidados com a esterilidade e com os procedimentos cirúrgicos tenham sido tomados, o índice de necrose foi alto e a quantidade de animais nos grupos controle e tratado ficou desigual, o que prejudicou a avaliação comparativa. Dos vinte animais utilizados para a padronização, 10 apresentaram necrose na extremidade distal da cauda e não puderam ser utilizados para a microlinfangiografia fluorescente. Foram avaliados 8 animais do grupo tratado com orlistat e apenas 2 animais do grupo controle, todos com evidente edema ao redor do tubo de silicone fixado à pele, principalmente na porção distal da ferida. Além disso, os animais tratados com orlistat também apresentaram aumento de volume na região abdominal. Os animais que permaneceram com o curativo e o gel de colágeno até o dia do sacrifício (n=10) tiveram cicatrização completa das feridas e foram utilizados para a microlinfangiografia fluorescente. Apesar do alto índice de necrose, pudemos observar neste estudo piloto que a região da ferida dos animais tratados com orlistat tinha áreas de extravasamento do dextrano marcado com FITC, o que não aconteceu nas feridas dos camundongos tratados apenas com o veículo (Figura 4). Estes resultados, ainda que bastante preliminares, sugerem que o tratamento com orlistat interfere na reparação linfática, causando extravasamento do líquido intersticial na região da ferida. O edema ocasionado pela cirurgia na porção distal da cauda foi semelhante nos animais dos grupos controle e tratado, portanto o retorno linfático não foi alterado significativamente pelo tratamento. Devido às dificuldades encontradas na padronização deste modelo de estudo de linfangiogênese em caudas de camundongos, principalmente as altas taxas de necrose tecidual, alteramos nossos planos iniciais e optamos

pela utilização das orelhas, de organização anatômica mais simples e conseqüentemente de manipulação mais fácil.

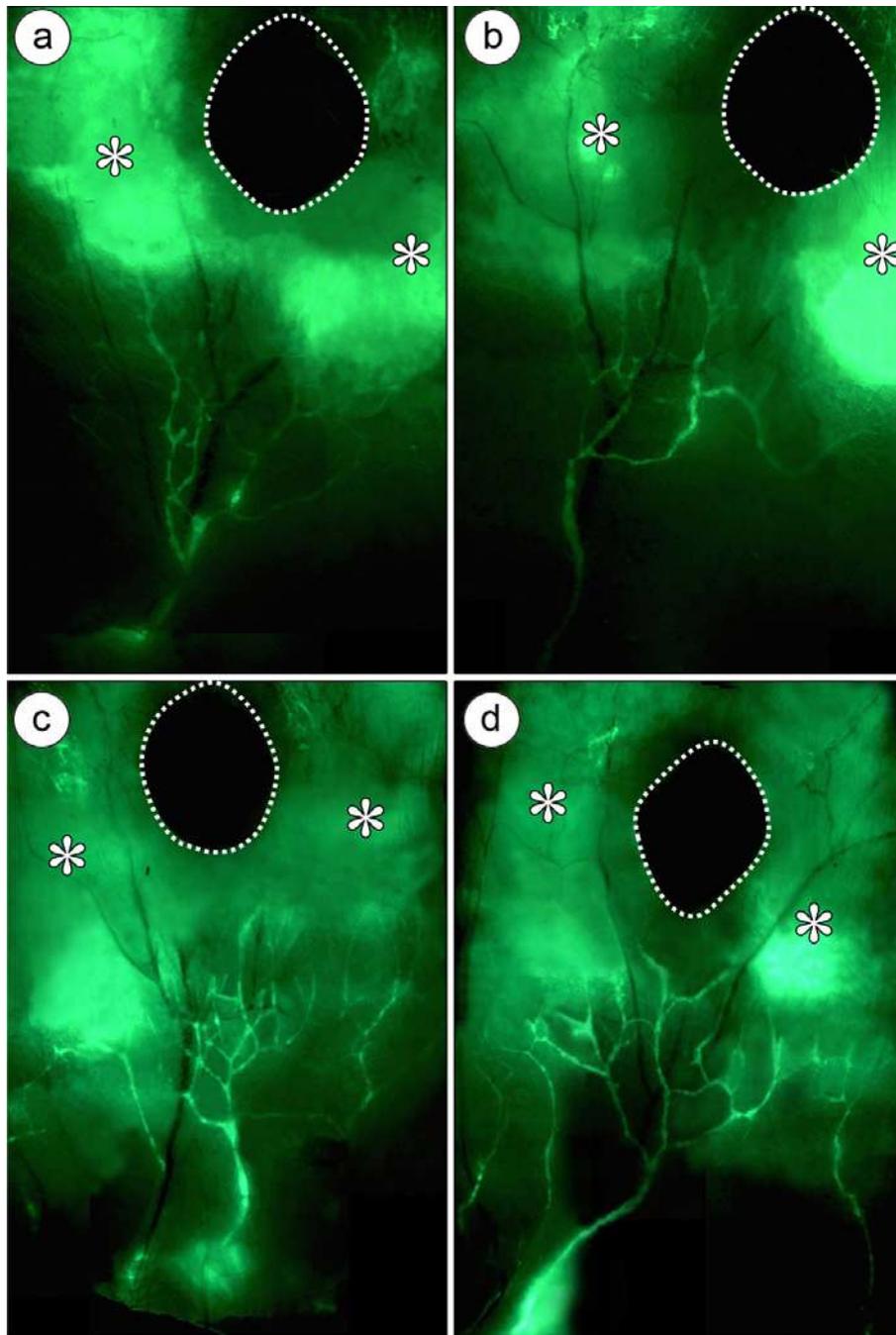


**Figura 4:** Organização da rede capilar linfática superficial, de formato hexagonal, na cauda de camundongos Balb-C observadas através de microlinfangiografia fluorescente após 45 dias da realização das feridas cirúrgicas (indicadas pelas linhas pontilhadas). Em **a** e **b** podemos notar o restabelecimento da rede capilar linfática em dois camundongos do grupo controle. Em **c** e **d** observamos o extravasamento do dextrano marcado com FITC (setas) no local da ferida cirúrgica dos camundongos tratados com orlistat (Aumento Original: 25 X).

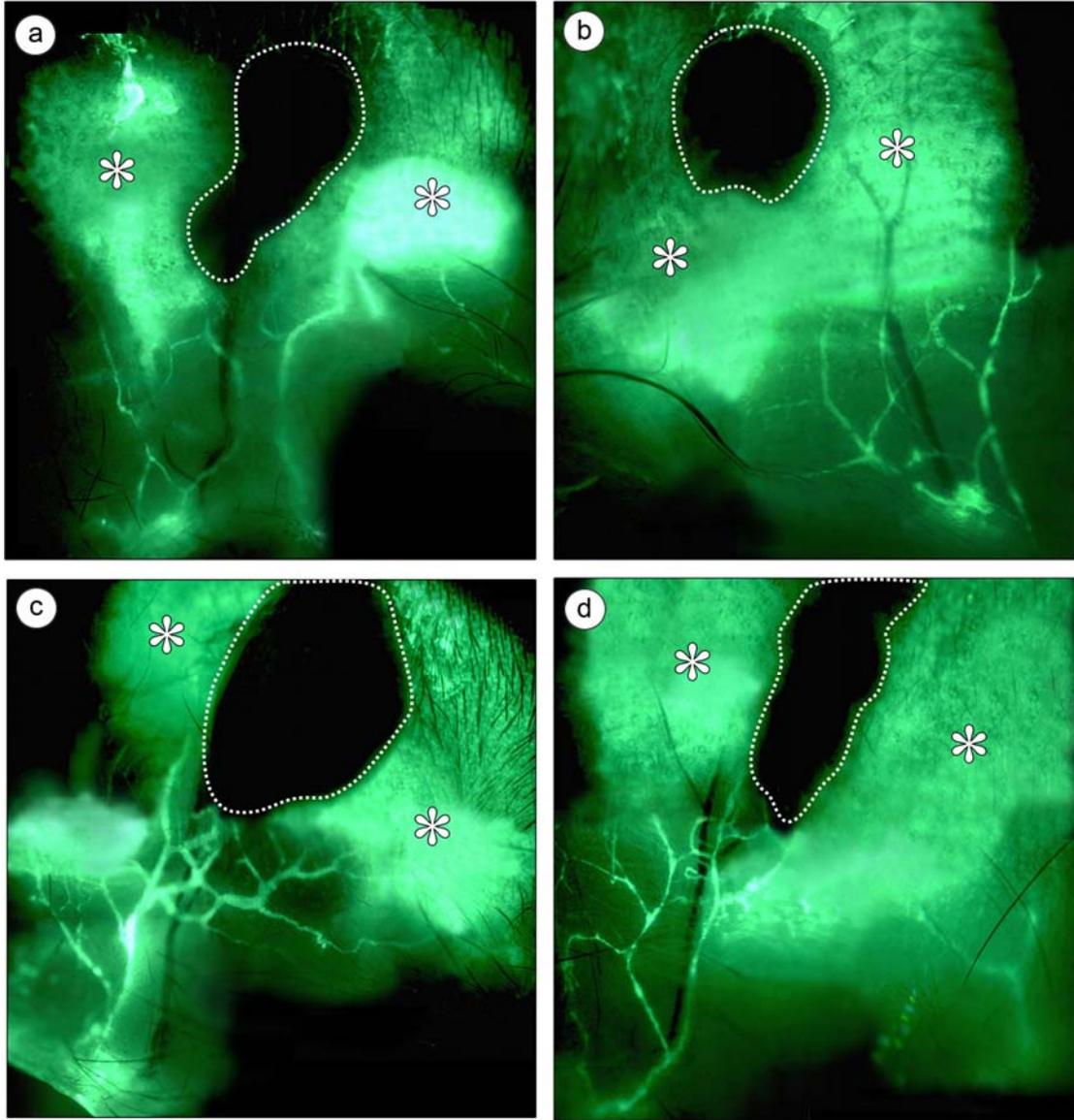
## **5.2. Avaliação da linfangiogênese em orelhas de camundongos Balb-C e C57Bl6 por microlinfangiografia fluorescente**

Os camundongos Balb-C e C57Bl6 que tiveram as orelhas perfuradas ou receberam o implante de células tumorais não apresentaram nenhuma alteração física ou comportamental além do aumento de volume abdominal, observado geralmente após 15 dias de tratamento com orlistat nos camundongos Balb-C.

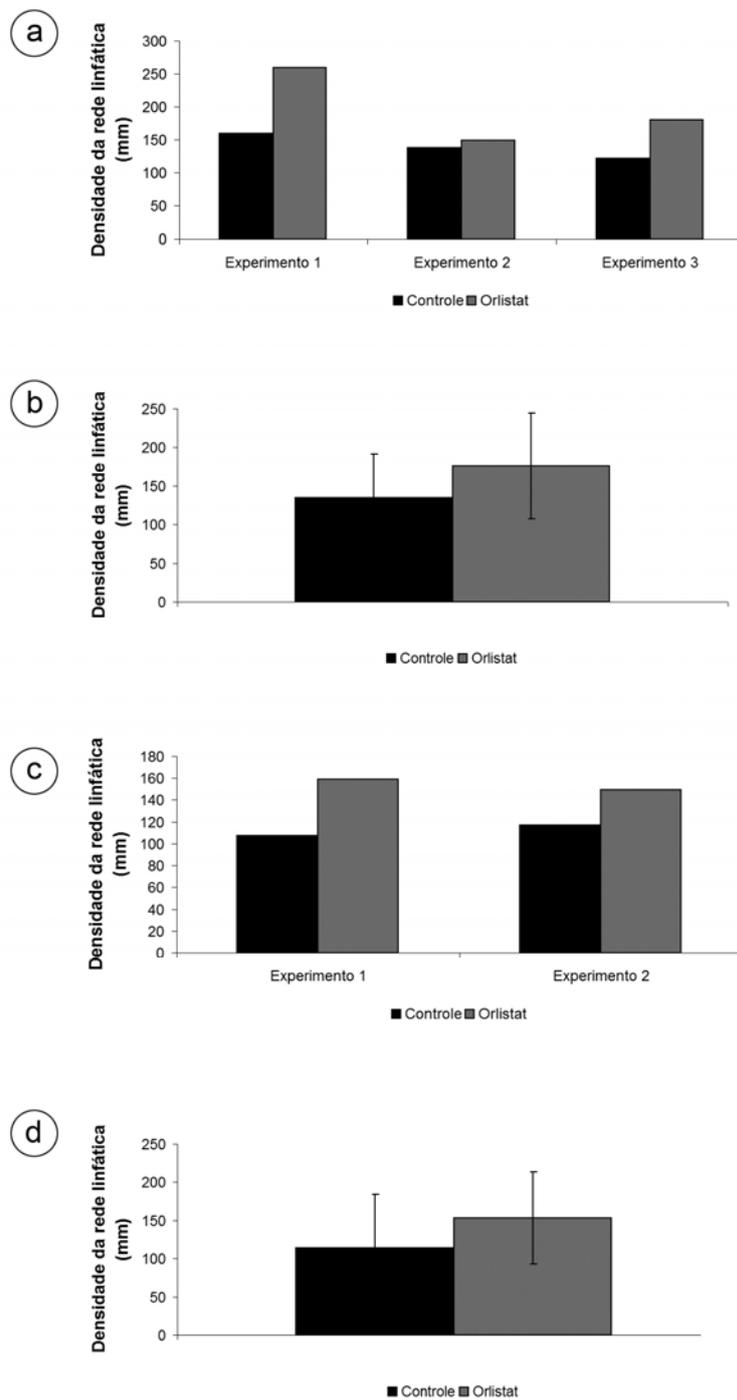
A microlinfangiografia fluorescente foi realizada em 4 experimentos distintos, totalizando 89 camundongos Balb-C (44 controle e 45 tratados com orlistat) e 29 camundongos C57Bl6 (14 controles e 15 tratados com orlistat). O tratamento com orlistat foi iniciado no mesmo dia da perfuração na orelha ou da injeção das células B16-F10, pois nosso objetivo era analisar o efeito da droga sobre a linfangiogênese induzida pela resposta inflamatória (Balb-C) ou pelo melanoma em crescimento (C57Bl6). Observamos que a quantidade de vasos marcados foi maior nos grupos tratados com orlistat do que nos grupos controles e que os vasos dos grupos tratados apresentaram mais ramificações, tanto nos camundongos Balb-C quanto nos C57Bl6. A extensão dos linfáticos evidenciados pelo substrato fluorescente foi estimada programa *Scion Image*, o que confirmou que os camundongos tratados com orlistat (com perfurações ou tumores) tiveram rede linfática mais extensa e ramificada do que os animais controle (Figuras 5, 6 e 7).



**Figura 5:** Imagens representativas da microlinfangiografia fluorescente em orelhas de camundongos Balb-C tratados com ETOH (**a** e **b**) ou com orlistat (**c** e **d**). No grupo controle observa-se menor ramificação, quando comparado ao grupo tratado com orlistat. As linhas pontilhadas representam o local da perfuração. Os asteriscos correspondem às regiões onde o substrato fluorescente foi injetado (Aumento Original: 25 X).



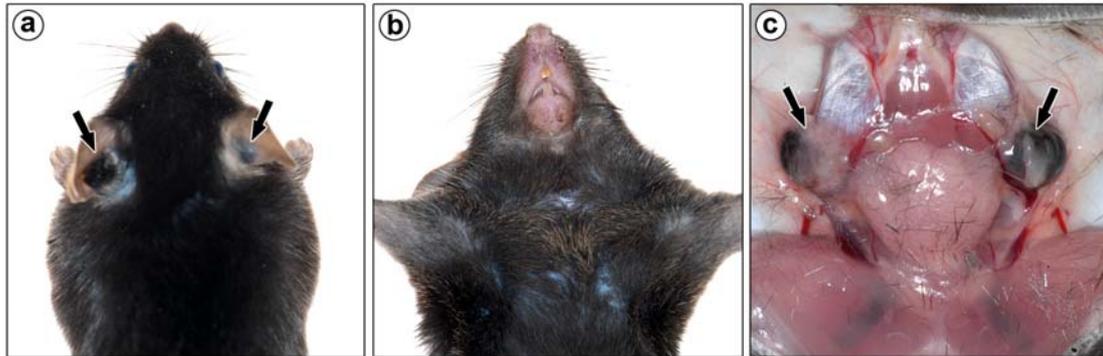
**Figura 6:** Imagens representativas da microlinfangiografia fluorescente na região peritumoral em orelhas de camundongos C57Bl6 tratados com ETOH (**a** e **b**) ou com orlistat (**c** e **d**). A região ocupada pelo melanoma experimental está demarcada com linhas pontilhadas. O grupo tratado com orlistat apresentou maior ramificação dos vasos linfáticos peritumorais em comparação com os controles. Os asteriscos correspondem às regiões onde o substrato fluorescente foi injetado (Aumento Original: 25 X).



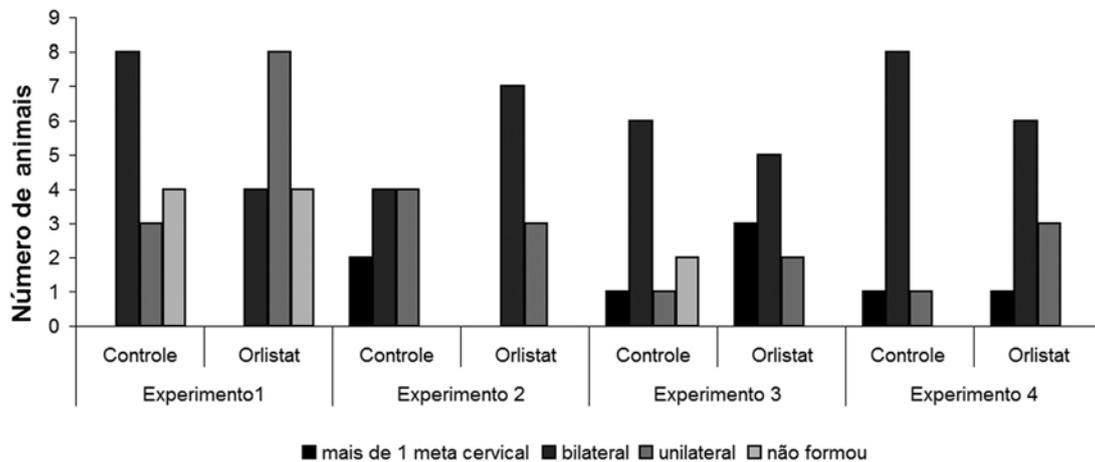
**Figura 7:** Medida da extensão dos vasos linfáticos marcados com dextrano-FITC 0,1% nas orelhas de camundongos Balb-C (a e b) e C57Bl6 (c e d). Podemos notar que os grupos tratados com orlistat tiveram quantidade significativamente de vasos linfáticos marcados pelo dextrano-FITC. (b) média dos experimentos mostrados em (a) ( $p < 0,001$  - teste t). (d) média dos experimentos mostrados em (c) ( $p < 0,05$  - teste t).

### **5.3. Efeito do tratamento com orlistat nos tumores primários e linfonodos metastáticos**

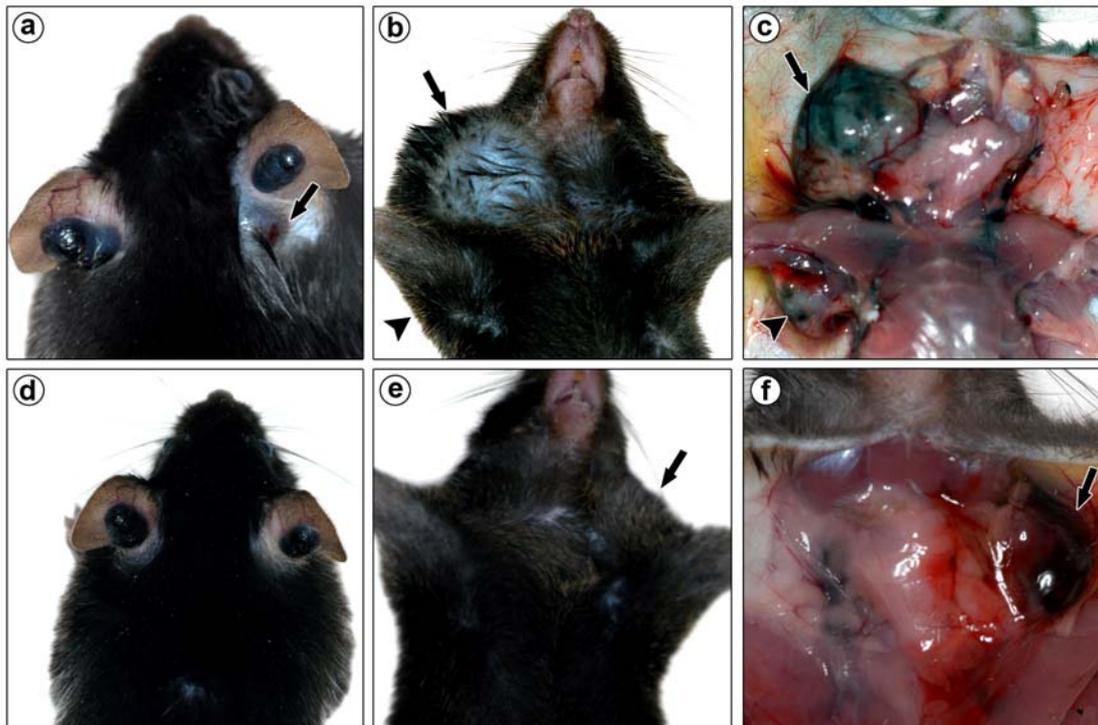
Depois de injetadas nas orelhas dos camundongos C57Bl6, as células B16-F10 desenvolvem tumores primários e posteriormente caem na circulação linfática, estabelecendo metástases em linfonodos cervicais. Neste trabalho, o comportamento biológico das metástases foi diversificado, sendo o padrão mais freqüente as metástases em linfonodos cervicais bilaterais (Figura 8), principalmente nos experimentos 3 e 4 (Figura 9). A Figura 10 mostra imagens representativas dos experimentos 3 e 4, nos quais o tratamento dos camundongos com orlistat reduziu o volume dos linfonodos metastáticos. Nestes mesmos experimentos, 2 animais do grupo controle apresentaram metástase em linfonodo axilar, o que não foi observado no grupo tratado com orlistat (Figura 10c). Foi também constatada a presença de linfonodos periauriculares metastáticos em animais de ambos os grupos (Figura 10a). Os tumores primários (57 animais) e as metástases em linfonodos cervicais (86 animais) foram medidos e seus volumes calculados. Os experimentos 1 e 2 diferiram dos experimentos 3 e 4 com relação ao tamanho dos tumores primários e de suas respectivas metástases. Os tumores primários do grupo tratado com orlistat dos experimentos 1 e 2 tiveram um volume ligeiramente menor, quando comparado com o grupo controle, sendo o contrário observado nos experimentos 3 e 4 (Figura 11).



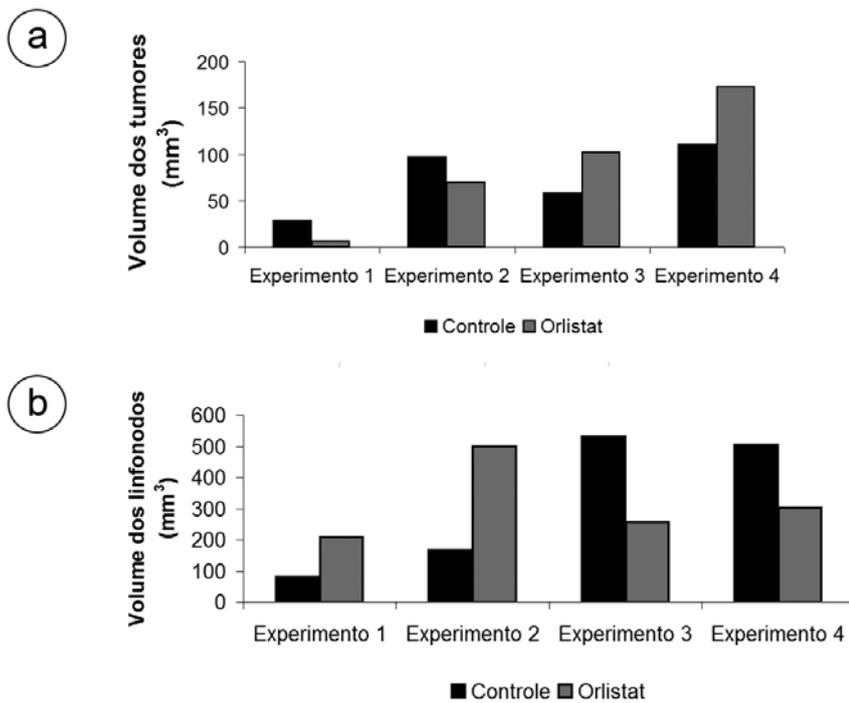
**Figura 8:** (a) Tumores primários desenvolvidos após a injeção intradérmica de células B16-F10 na orelha de camundongos C57Bl6 (setas). (b) Região cervical do mesmo camundongo apresentado em a, aparentemente sem aumento volumétrico. (c) Metástases em linfonodos cervicais bilaterais (setas) foram freqüentes neste experimento, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com orlistat.



**Figura 9:** Padrão de metástases cervicais observado nos quatro experimentos realizados. A metástase em linfonodo cervical bilateral foi o padrão mais freqüente em todos os experimentos, exceto no grupo orlistat do experimento 1, no qual o número de animais com metástases unilaterais foi 50% maior que o de animais com metástases bilaterais. No grupo controle do experimento 2, o número de animais com metástase unilateral foi igual ao número de animais com metástases bilaterais.

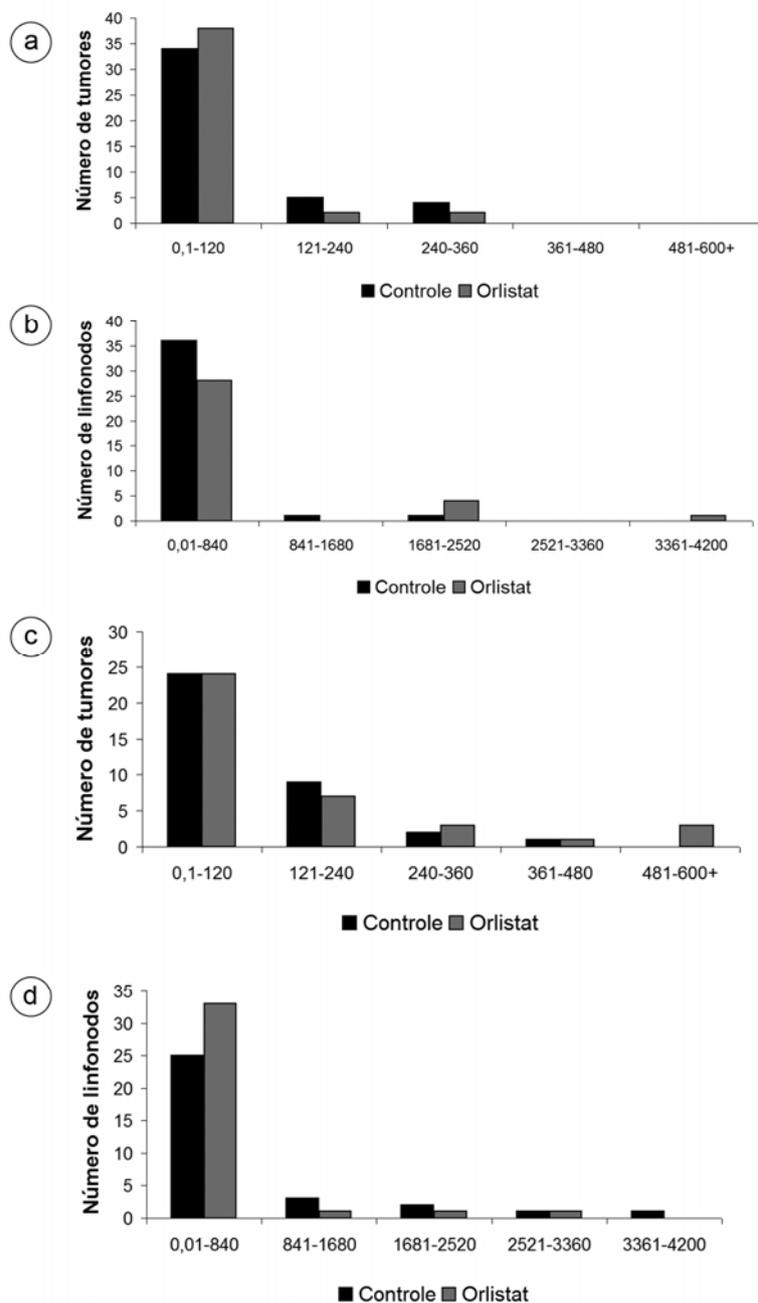


**Figura 10:** Camundongos C57Bl6 que receberam implantes de células de melanoma representativos dos grupos controle (**a, b, c**) ou tratados com orlistat (**d, e, f**). Tumores primários de volumes semelhantes (**a e d**) podem ocasionar metástases de tamanhos variáveis. Em **a**, podemos notar ainda a presença de linfonodo metastático periauricular (seta). Em **b** nota-se aumento de volume cervical (seta) e axilar (cabeça de seta), causado pelas metástases em camundongo controle. Em **e** podemos notar discreto aumento de volume cervical em camundongo tratado com orlistat (seta). Após dissecação podemos notar metástases em linfonodos cervicais e axilares (**c**, setas e cabeça de seta, respectivamente) e metástase em linfonodo cervical esquerdo em camundongo tratado com orlistat (**f**, seta).



**Figura 11:** O gráfico de barras da figura **a** mostra que a média dos volumes dos tumores primários foi maior no grupo controle nos experimentos 1 e 2, o contrário ocorreu nos experimentos 3 e 4. Em **b** podemos observar que o volume dos linfonodos foi maior no grupo tratado com orlistat nos experimentos 1 e 2 e menor nos experimentos 3 e 4.

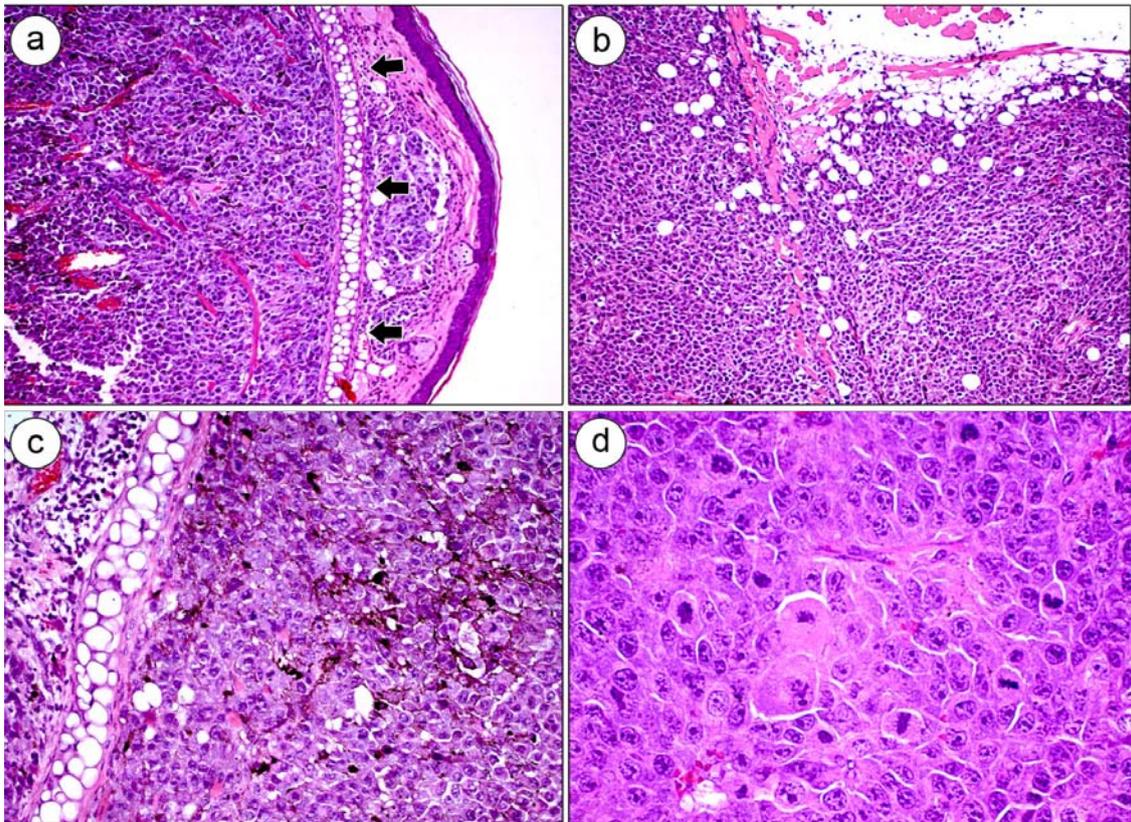
Como não houve diferença entre as médias dos volumes dos tumores e linfonodos nos 4 experimentos realizados, os experimentos foram agrupados de acordo com o comportamento clínico. Nos experimentos 1 e 2 o volume máximo dos tumores foi de 320 mm<sup>3</sup>, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado, já nos experimentos 3 e 4 ocorreram tumores de até 405 mm<sup>3</sup> no grupo controle e de até 607,5 no grupo tratado. Os linfonodos do grupo controle dos experimentos 1 e 2 tiveram o tamanho máximo de 1800 mm<sup>3</sup> no grupo controle e 4000 mm<sup>3</sup> no grupo tratado. Nos experimentos 3 e 4, o volume máximo dos linfonodos controle foi de 4200 mm<sup>3</sup> e de 1943 mm<sup>3</sup> no grupo tratado. Portanto, os experimentos 1 e 2 mostraram tumores primários maiores no grupo controle e linfonodos metastáticos com maior volume no grupo tratado com orlistat. O contrário ocorreu nos experimentos 3 e 4, onde o tamanho dos tumores primários foi equivalente e o número de linfonodos metastáticos grandes foi maior no grupo controle. No entanto, animais do grupo tratado com orlistat também apresentaram grandes metástases em linfonodos, porém em menor número que do grupo controle. A Figura 12 mostra os gráficos referentes aos volumes dos tumores e linfonodos separados por faixas de tamanho.



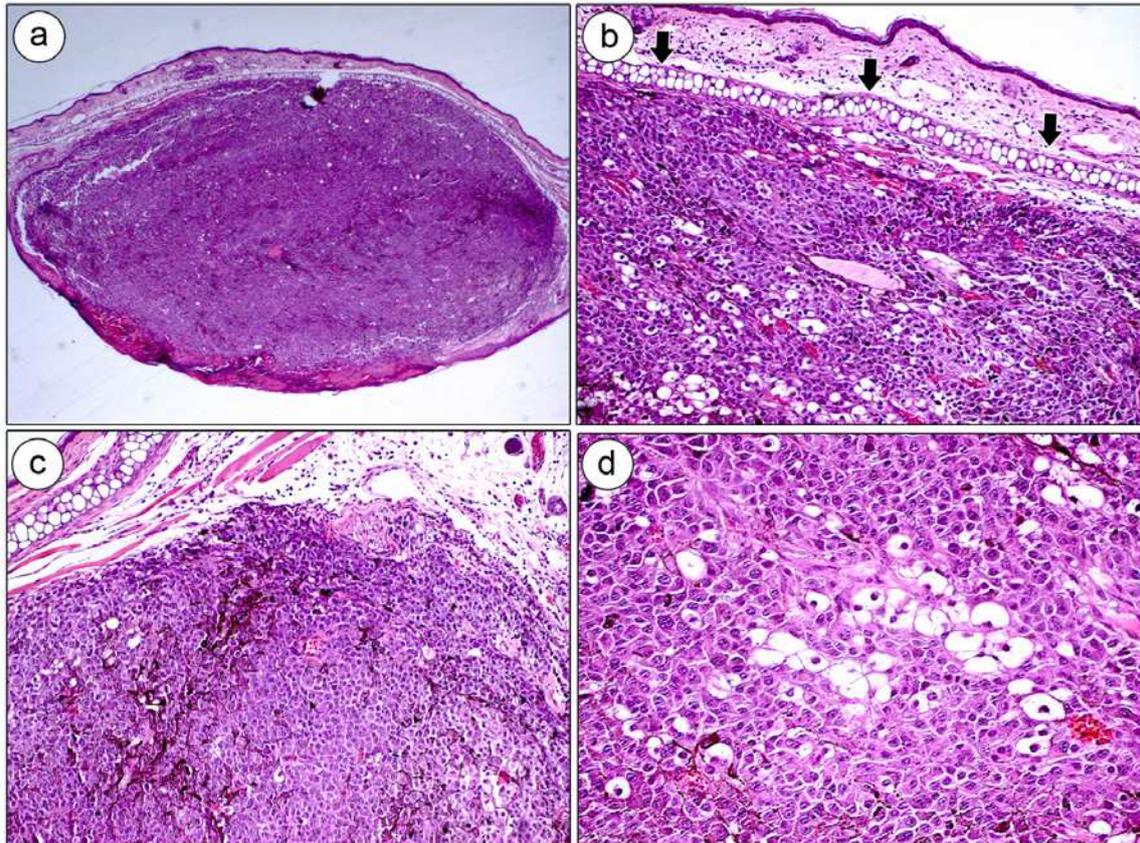
**Figura 12:** Nos experimentos 1 e 2 os maiores tumores primários (121-360 mm<sup>3</sup>) ocorreram nos animais do grupo controle (a) e os linfonodos metastáticos com maior volume (1681-2520 mm<sup>3</sup>) ocorreram nos animais do grupo tratado com orlistat (b). O contrário ocorreu nos experimentos 3 e 4. Conforme pode ser observado em c e d, o número de tumores primários considerados pequenos (0,1-120 mm<sup>3</sup>) foi equivalente entre os grupos e o número de linfonodos metastáticos pequenos (0,01-840 mm<sup>3</sup>) foi maior no grupo tratado. No grupo controle foi encontrado o maior número de linfonodos classificados em faixas maiores de tamanho.

#### **5.4. Análise microscópica dos tumores primários e metástases**

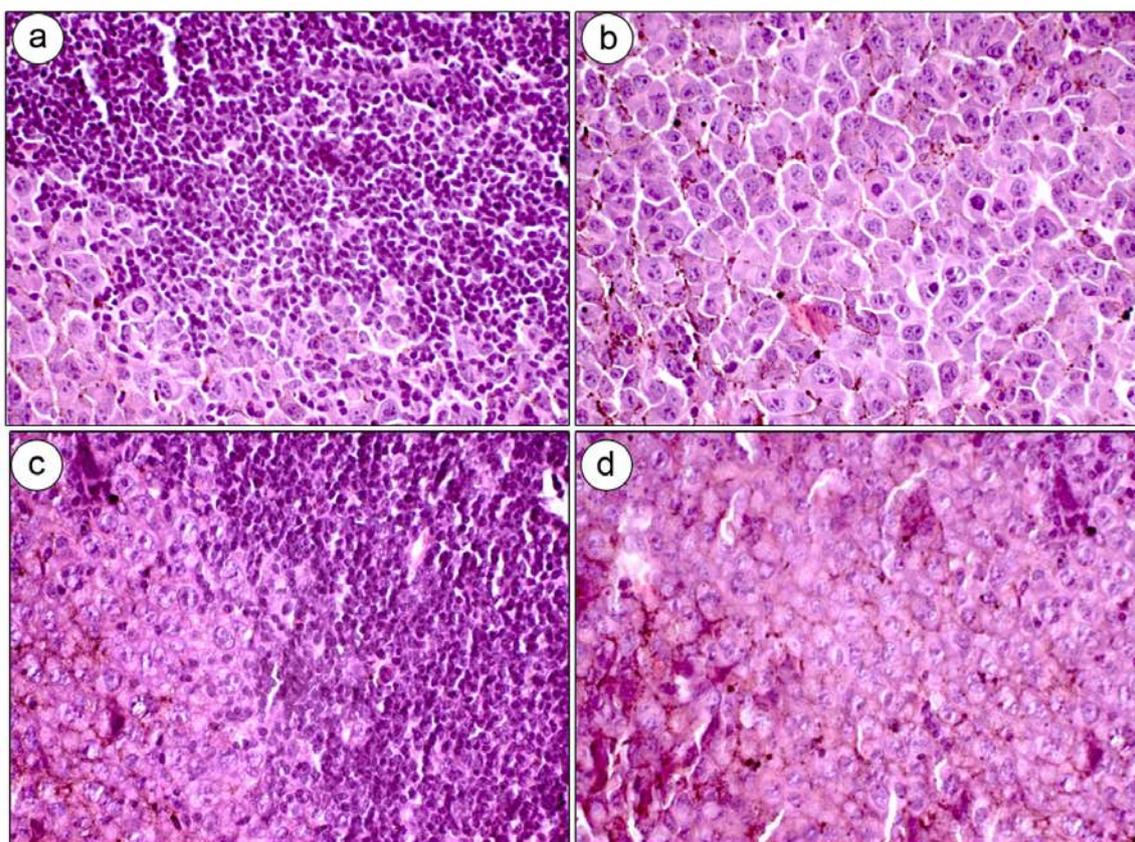
Fragmentos de tumores primários e linfonodos metastáticos foram coletados para análise microscópica. Os aspectos microscópicos dos tumores primários dos animais tratados ou não com orlistat foram semelhantes, destacando-se as células tumorais com núcleos hipercromáticos, múltiplos nucléolos, pigmentação citoplasmática por melanina, figuras de mitose atípicas, áreas de necrose e vasos sangüíneos neoformados (Figura 13 e 14). Um achado microscópico interessante foi a presença de células arredondadas e claras, com núcleos excêntricos, semelhantes a adipócitos (Figura 13d). Os demais tecidos coletados (pulmões, coração, fígado, baço e cérebro) não apresentaram indícios macroscópicos de metástases. Houve formação de metástases em linfonodos periauriculares (Figura 15a) em ambos os grupos. As metástases para linfonodos cervicais foram microscopicamente confirmadas (Figura 15b) e caracterizadas por invasão da região periférica dos linfonodos pelas células B16-F10.



**Figura 13:** Fotomicrografias representativas dos tumores primários de animais dos grupos controle. Em **a** pode-se observar células tumorais com intensa pigmentação melânica e numerosos vasos sanguíneos, com área adjacente à cartilagem auricular (setas). Células arredondadas, com citoplasma claro, semelhantes a adipócitos estão presentes em grande quantidade (**b**). Em **c** observamos intensa pigmentação melânica. Figuras de mitose e pleomorfismo celular foram frequentemente encontrados, demonstrando a agressividade deste tumor (**d**). HE, Aumentos Originais **a:** 50X, **b:** 50X, **c:** 100X e **d:** 400X.



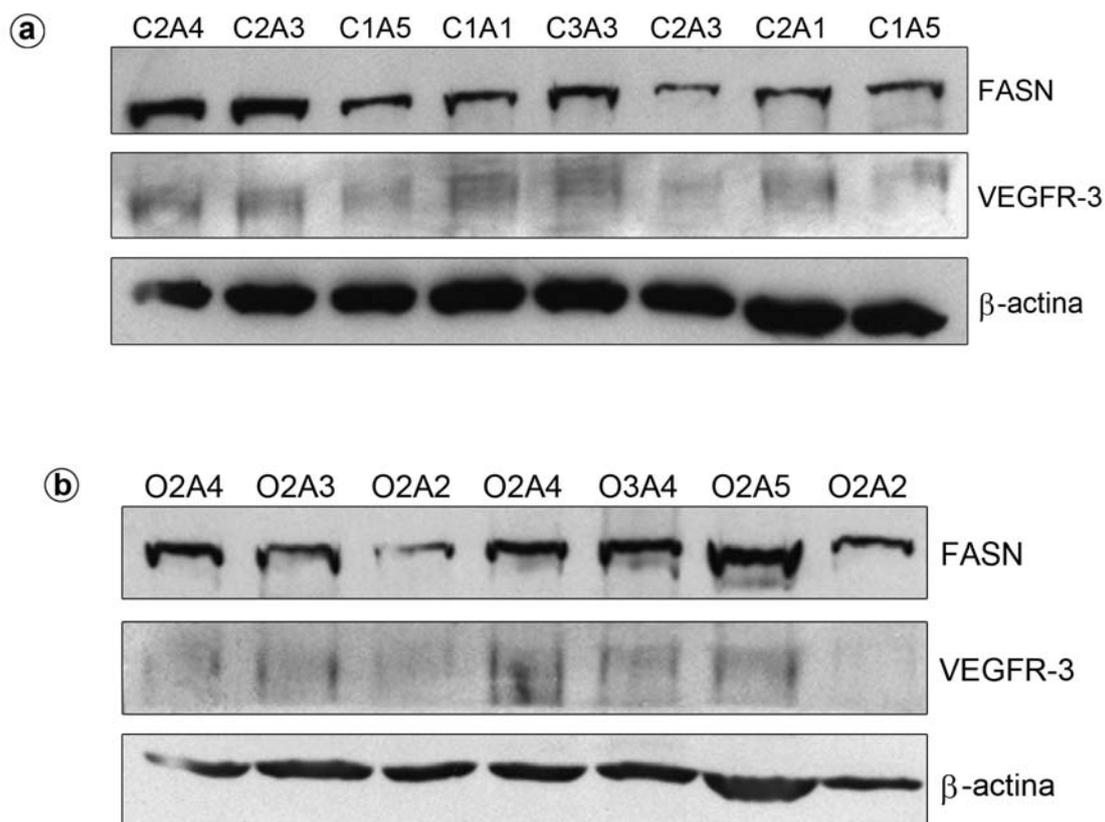
**Figura 14:** Fotomicrografias representativas dos tumores primários de animais do grupo tratado com orlistat. Em **a** podemos ter uma visão geral do tumor. Em **b** observa-se grande quantidade de vasos sangüíneos em área adjacente à cartilagem (setas). Melanócitos malignos e intensa pigmentação melânica podem ser observados em **c**. Células arredondadas, com citoplasma claro, semelhantes a adipócitos, estão presentes em grande quantidade (**d**). HE, Aumentos Originais **a**: 50X, **b**: 100X, **c**: 100X e **d**: 200X.



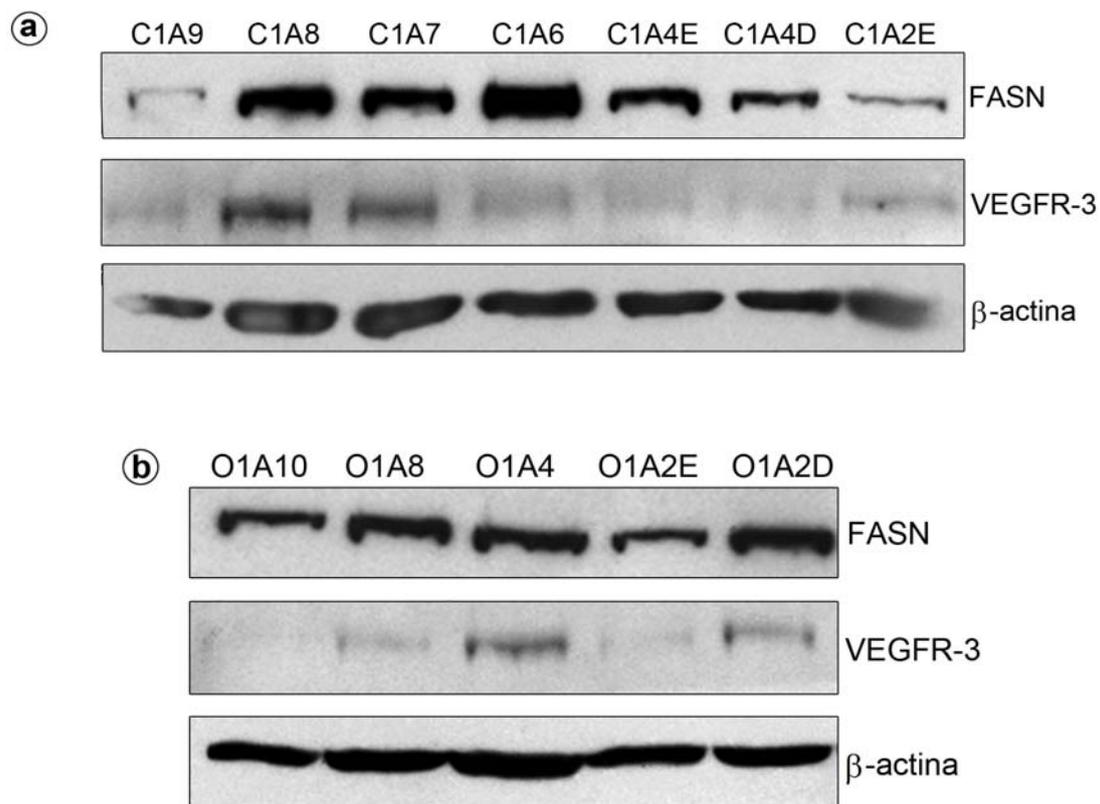
**Figura 15:** Fotomicrografias representativas dos linfonodos metastáticos do grupo controle (**a** e **b**) e do grupo tratado com orlistat (**c** e **d**). O tecido linfonodal está invadido pela massa tumoral (**a** e **c**) em ambos os grupos, pigmentação melânica, pleomorfismo celular e figuras de mitose. Aumento Original **a:** 50X, **b:** 200X, **c:** 50X e **d:** 200X.

### **5.5. Expressão das proteínas FASN e VEGFR-3 nos tumores primários e metástases em linfonodos cervicais**

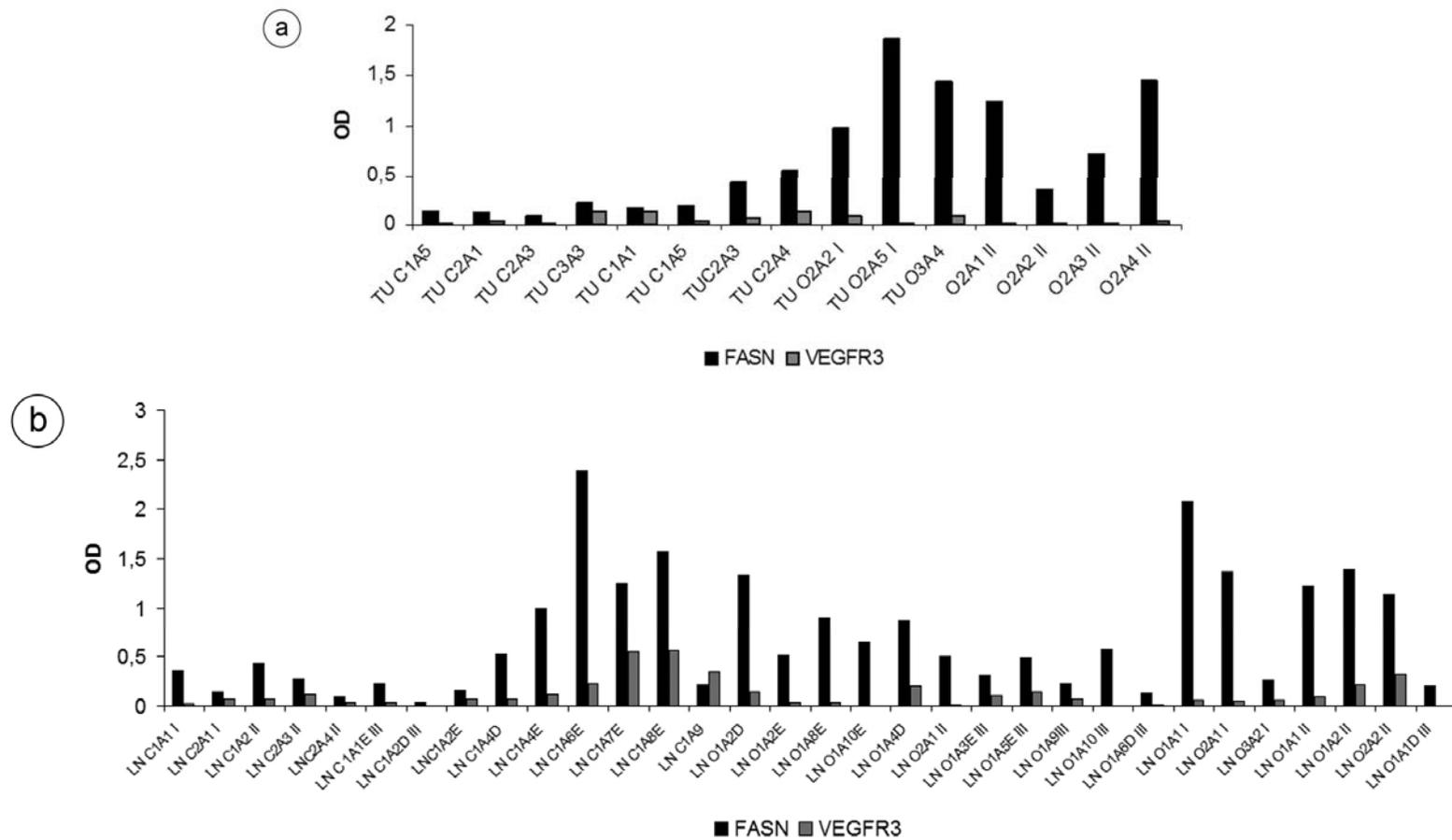
Para a extração de proteínas foram utilizados 8 tumores primários do grupo controle, 7 tumores primários do grupo tratado com orlistat, 14 linfonodos do grupo controle e 18 linfonodos do grupo tratado com orlistat dos experimentos 1, 2 e 3. A quantidade das proteínas FASN e VEGFR-3 nos tumores (Figura 16) ou linfonodos (Figura 17) variou bastante, tanto no grupo tratado ou controle. As análises densitométricas (Figuras 18 e 19) mostraram que a expressão de FASN foi maior do que a de VEGFR-3 em todos os extratos protéicos, no entanto, não foram observados padrões nitidamente distintos entre as quantidades destas proteínas nos tumores ou linfonodos do grupo controle ou tratado. A quantidade da proteína FASN foi maior nos tumores primários dos animais tratados com orlistat do que nos controles, ao passo que, a expressão de VEGFR-3 no grupo tratado foi menor (Figura 18a). Os linfonodos que tiveram maior expressão de FASN e VEGFR-3 foram do grupo controle, no entanto, alguns linfonodos do grupo tratado com orlistat também tiveram alta expressão de FASN (Figura 18b). A Figura 16 mostra as análises densitométricas das reações de western blot separadas por experimento, pois nos experimentos 1 e 2 os linfonodos do grupo controle tinham menor volume que no grupo tratado, o contrário do que ocorreu nos experimentos 3 e 4. No experimento 1 FASN foi mais expressa no grupo tratado e a expressão de VEGFR-3 nos linfonodos foi baixa tanto no grupo controle quanto no grupo tratado (Figura 19a). No experimento 2 a expressão de FASN e VEGFR-3 foi maior nas amostras do grupo tratado com orlistat (Figura 19 b). Quando os resultados das densitometrias dos experimentos 1 e 2 são agrupados, o mesmo padrão do experimento 2 é observado (Figura 19c). Em contraste, no experimento 3, a expressão tanto de FASN quanto de VEGFR-3 foi maior nas amostras do grupo controle (Figura 19d). Além disso nenhuma relação foi encontrada entre a produção destas proteínas e o volume dos tumores ou linfonodos.



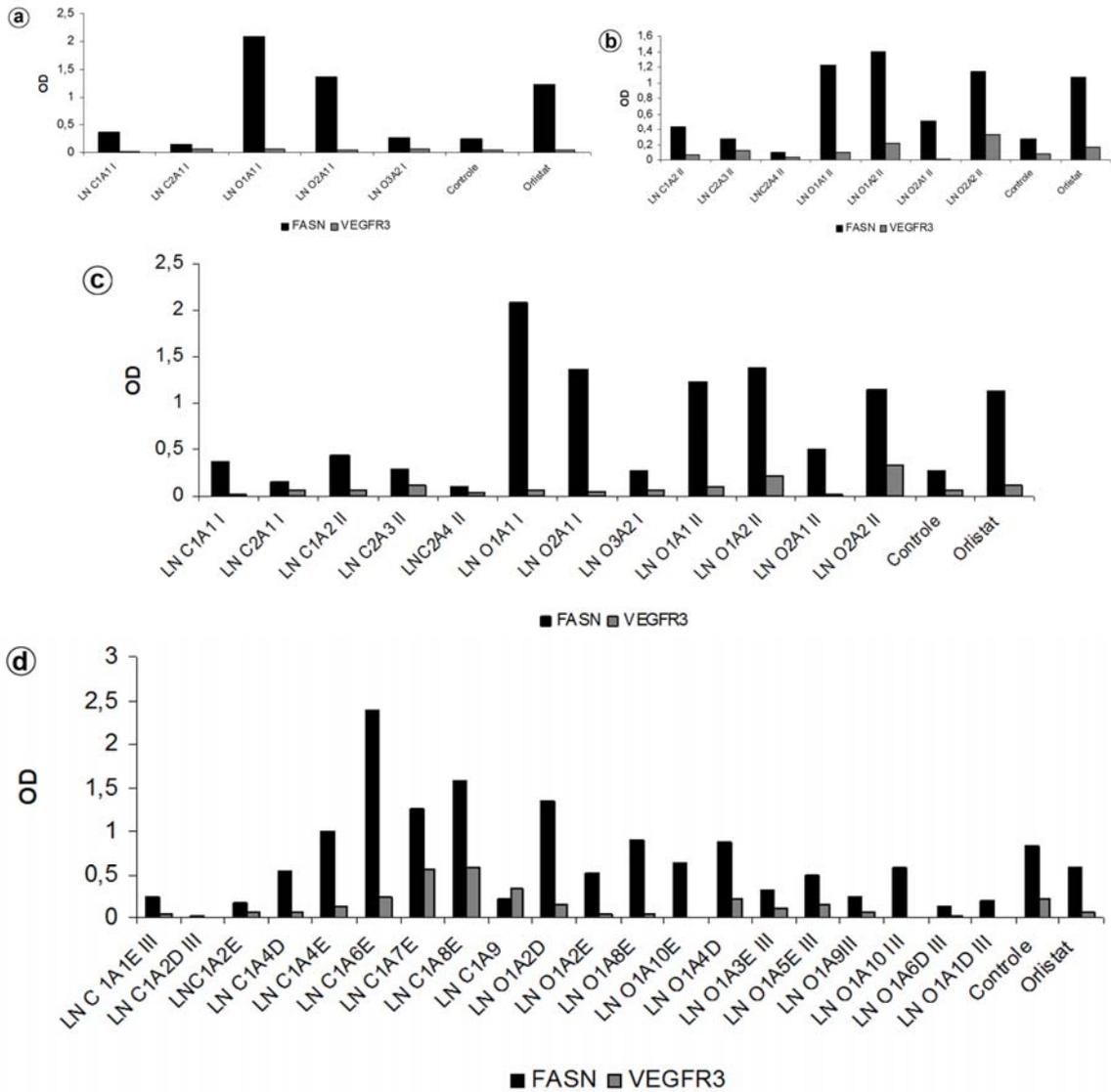
**Figura 16:** Reações de western blot representativas do efeito do tratamento com orlistat sobre a quantidade das proteínas FASN e VEGFR-3 em tumores primários. Notamos que tanto os tumores tratados com orlistat (b) como os controles (a) produzem grande quantidade da enzima FASN. Os tumores nos controle (a) tiveram expressão de VEGFR-3 maior, quando comparados com os tumores do grupo tratado (b). Anticorpos contra  $\beta$ -actina foram utilizados para comprovar a presença de quantidades semelhantes de proteína total em cada canaleta.



**Figura 17:** Experimentos de western blot representativos do efeito do tratamento com orlistat sobre a quantidade das proteínas FASN e VEGFR-3 em linfonodos metastáticos. Nota-se grande quantidade da enzima FASN tanto nos linfonodos controle (a) como tratados (b), enquanto que os linfonodos controle tiveram expressão de VEGFR-3 maior (a). Anticorpos contra  $\beta$ -actina foram utilizados para comprovar a presença de quantidades semelhantes de proteína total em cada canaleta.



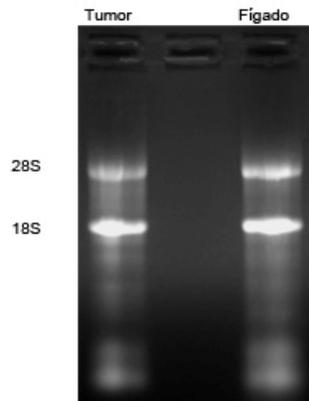
**Figura 18:** Representação gráfica da produção de FASN e VEGFR-3 a partir das análises densitométricas das reações de western blot dos tumores primários de camundongos C57Bl6 tratados com veículo etanol (a- amostras TUC1A5-TUC2A4) ou orlistat (a- amostras TUO2A2 I-TUO2A4 II) e de linfonodos metastáticos do grupo controle (b- amostras LNC1A1 I-LNC1A9) e grupo tratado (b- amostras LNO1A2D-LNO1A1DII).



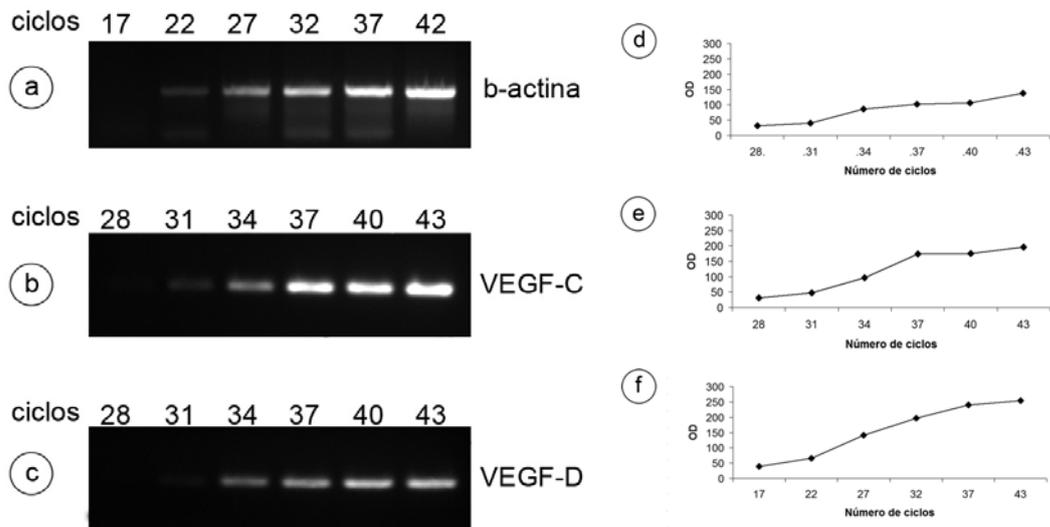
**Figura 19:** Representação gráfica individualizada da expressão das bandas de FASN e VEGFR-3 a partir das análises densitométricas das reações de western blot dos linfonodos dos grupos controle e orlistat dos experimentos I (a), II (b), I e II (c) e III (d).

## **5.6. Padronização dos primers para detecção de VEGF-C e VEGF-D através de RT-PCR**

O RNA total foi extraído de amostra de tumor do grupo controle e de fígado (controle positivo da reação) e aplicado em gel desnaturante de formaldeído-agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo, para verificar sua integridade (Figura 20). Para a localização da fase exponencial de amplificação, utilizamos 1 $\mu$ l do RNA extraído do tumor controle em cada uma das 6 reações de PCR preparadas. Cada reação foi paralizada em um ciclo diferente (VEGF-C e VEGF-D: 28, 31, 34, 37, 40 e 43;  $\beta$ - actina: 17, 22, 27, 32, 37 e 42) e o produto aplicado em gel de agarose 1,8% (Figura 21 **a, b, c**). Bandas de intensidades crescentes foram observadas, cujas análises densitométricas podem ser observadas na Figura 21 **d, e, f**. Através deste experimento, determinamos o número de ciclos ideal para as reações de RT-PCR para cada um dos genes:  $\beta$ -actina (35 ciclos), VEGF-C e VEGF-D (37 ciclos).



**Figura 20:** Gel de formaldeído-agarose a 1,2% onde foi aplicado 1µg de RNA de cada amostra, para verificação da integridade pela presença das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S. Coloração com brometo de etídeo.



**Figura 21:** Gel de agarose a 1,8% onde foram aplicados 12µl dos produtos de RT-PCR realizado com 1µg de RNA. Foram preparadas 6 reações de PCR idênticas e paralisadas em diferentes ciclos, a partir dos quais foi determinado o número que melhor represente a fase exponencial da reação de PCR para cada um dos genes. Determinamos o número de ciclos que representa a fase exponencial dos genes  $\beta$ -actina (**a** e **d** 35 ciclos), VEGF-C e VEGF-D (**b**, **c**, **e** e **f**- 37 ciclos).

## 6. DISCUSSÃO

---

---

A literatura científica tem demonstrado que a enzima FASN pode ser alvo importante para a quimioterapia ou mesmo quimioprevenção de diversas neoplasias malignas, pois sua expressão é baixa ou ausente na maioria dos tecidos humanos adultos normais e elevada no câncer (Epstein *et al.*, 1995; Pizer *et al.*, 1998b; Krontiras *et al.*, 1999; Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2000a; Piyathilake *et al.*, 2000; Nemoto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002; Swinnen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Innocenzi *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2003; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004; Kapur, 2005a; Kapur, 2005b; Van de Sande *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Orita *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2008; Orita *et al.*, 2008; Okawa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Além disso, e talvez ainda mais importante, estudos mostram que há uma associação entre a expressão de FASN e o prognóstico dos pacientes portadores de alguns destes tumores, como os de próstata, ovário, tireóide, cavidade bucal, rins, cólon e também o melanoma (Epstein *et al.*, 1995; Gansler *et al.*, 1997; Vlad *et al.*, 1999; Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Innocenzi *et al.*, 2003; Takahiro *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Kapur *et al.*, 2005b; Horigushi *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2008). Os inibidores específicos da atividade de FASN são capazes de bloquear a progressão do ciclo celular, diminuindo a proliferação e aumentando as taxas de apoptose em células derivadas de neoplasias malignas de próstata, mama, estômago, intestino, endométrio, cavidade bucal, ovário e melanoma (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005; Menendez *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008). Em melanomas, objeto de parte de nosso estudo, foi observada uma correlação positiva entre expressão de FASN e índice de Breslow, além de uma correlação inversa entre a presença de FASN e o tempo de sobrevida total dos pacientes (Innocenzi *et al.* 2003).

O fenótipo angiogênico de um tumor é adquirido como consequência direta de sua intensa proliferação celular, que causa um rápido aumento da distância entre as células tumorais e os vasos sanguíneos, assim como a formação de vasos sanguíneos com capacidade limitada de difusão de oxigênio e nutrientes para as regiões mais internas do tumor, resultando no surgimento de um microambiente hipóxico, com acidose e aumento da pressão intersticial (Denko, 2008). Células neoplásicas em situação de hipóxia, acumulam o fator indutor de hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), que por sua vez, estimula a formação de novos vasos e consequente re-oxigenação tecidual através da transcrição de VEGF e do aumento da expressão de seus receptores nas células endoteliais pré-existentes nas proximidades do tumor (revisado por Dewhirst *et al.*, 2008). Embora a expressão do HIF-1 $\alpha$  esteja correlacionada com a hipóxia tecidual, há evidências de que este fator está também implicado em funções biológicas que requerem sua ativação em condições normóxicas (revisado por Semenza, 2003). As principais funções do VEGF são promover a sobrevivência, induzir a proliferação e promover a migração e invasão de células endoteliais na matriz extracelular, contribuindo para o processo de angiogênese. O VEGF regula estas funções através da interação com os receptores de superfície tipo tirosina-quinase e da transmissão de sinais que induzem a produção de várias proteínas (Norrby *et al.*, 2006). No entanto, os vasos neoformados via VEGF-A são geralmente desorganizados e apresentam alto número de fenestrações (Cao *et al.*, 2004).

Em recente 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 tumores primários com formação de metástases nos linfonodos mediastínicos em 100% dos casos. Um dos resultados mais importantes deste estudo foi que o tratamento destes animais com orlistat reduziu em cerca de 50% o número de linfonodos metastáticos. Uma possível explicação para este fato pode ser a de que a inibição de FASN tenha interferido concomitantemente nos processos de angiogênese e linfangiogênese.

No presente trabalho, a inibição da atividade de FASN causou significativo aumento na extensão e ramificação dos vasos linfáticos nas orelhas de camundongos Balb-C ou C57Bl6, tanto ao redor das feridas experimentais como nos melanomas provocados pelas células B16-F10. Até o momento, a relação entre a inibição de FASN e a linfangiogênese não foi descrita na literatura. Os mecanismos biológicos responsáveis pelo aumento na densidade dos vasos linfáticos precisam ainda ser elucidado, entretanto, nossos achados podem estar relacionados a um mecanismo compensatório semelhante ao que ocorre frente à hipóxia. Dentro deste contexto, Browne *et al.* (2006) demonstraram que orlistat inibe FASN em células endoteliais humanas (HUVEC), nas quais bloqueia eficientemente a síntese de ácidos graxos e conseqüentemente reduz a proliferação. Além disso, os mesmos autores observaram que o orlistat inibe a neovascularização em ensaio *ex vivo*, o que sugere fortemente uma atuação como droga antiangiogênica, por prevenir a expressão do VEGFR-2 na superfície das células endoteliais. Por outro lado, em estudo realizado por Menendez *et al.* (2005d), a inibição específica da atividade de FASN com c75 ocasionou um aumento dose-dependente na produção de VEGF-A (maior do que 500%) em células de câncer de mama com alta expressão de ErbB2. Ao mesmo tempo, o bloqueio da atividade de FASN ativou substancialmente a via MAPK, causando um acúmulo de HIF-1 $\alpha$  nestas mesmas células. O aumento da quantidade de VEGF, a ativação de MAPK e o acúmulo de HIF-1 $\alpha$  também foram observados quando o gene que codifica a FASN foi silenciado através de RNAi. Portanto, estes mesmos autores sugerem que a inibição do metabolismo endógeno de ácidos graxos nas células tumorais desencadeia uma reação semelhante ao que ocorre em condições de hipóxia, que ativamente recupera a cascata MAPK-HIF-1 $\alpha$ -VEGF dependente de ErbB2. Segundo Isaka *et al.* (2004), vasos linfáticos localizados na periferia de melanomas provocados experimentalmente pela injeção de células B16-F10 geneticamente modificadas para expressar grandes quantidades de VEGF-C em camundongos, são mais numerosos e menos eficientes. Segundo esses autores, 40% dos linfáticos associados a estes tumores

continham células endoteliais linfáticas em proliferação e apresentavam drenagem retrógrada, sugerindo disfunção nas válvulas intraluminais.

As diferenças por nós observadas na extensão e densidade dos vasos linfáticos nos animais tratados com orlistat foram muito nítidas e, como mencionado anteriormente, poderiam ser atribuídas a um aumento da produção de VEGF-C ou -D ou de seus receptores. Entretanto, o bloqueio da FASN pode ter modificado simultaneamente a permeabilidade dos vasos pré-existentes e aumentado a eficiência de captação do substrato fluorescente, pois em alguns animais tratados estes se mostraram mais calibrosos do que nos controles. Não pudemos observar, através da microlinfangiografia fluorescente os vasos linfáticos intratumorais, possivelmente devido a presença de grande quantidade de pigmentação melânica nos tumores. Estamos planejando para nossos experimentos futuros, uma avaliação imunohistoquímica da presença e/ou densidade de células endoteliais linfáticas no interior dos melanomas experimentais, em animais tratados ou não com orlistat. No entanto, Leu *et al.* (2000) não detectaram vasos linfáticos no interior de tumores induzidos pela injeção de células de fibrossarcoma (FSall), apesar da positividade para marcadores linfáticos como o VEGFR-3, e discutiram a possibilidade de um colapso dos vasos devido ao estresse no microambiente tumoral causado pela proliferação celular. Além disso, estes pesquisadores verificaram através de microlinfangiografia fluorescente que os vasos linfáticos peritumorais apresentavam diâmetro aumentado.

Sabe-se que a expressão de VEGF-C em melanomas primários parece prever a disseminação metastática para linfonodos (Padera *et al.*, 2002; Schietroma *et al.*, 2003) e que a proteína VEGF-D tem um papel importante tanto na linfangiogênese fisiológica quanto tumoral, tendo inclusive correlações importantes com características clinicopatológicas e sobrevida dos pacientes (Currie *et al.*, 2004). Está bem estabelecido na literatura que VEGF é regulado por HIF-1 $\alpha$ , no entanto, há evidências que outros membros da família VEGF podem também ser induzidos por este fator de transcrição. Entretanto, o efeito da hipóxia

na linfangiogênese e o papel de HIF-1 $\alpha$  como um regulador efetivo de VEGF-C e VEGF-D são ainda pobremente estudados e os dados escassos. Os níveis de mRNA para VEGF-C foram elevados por hipóxia em células em câncer de esôfago humano e HIF-1 $\alpha$  foi correlacionado com a produção de VEGF-C e metástases linfáticas em câncer de esôfago (Katsuta *et al.*, 2005). Além disso, hipóxia pode aumentar a expressão dos transcritos que codificam VEGF-C e -D, assim como dos receptores VEGFR-3 em células endoteliais (Nilsson *et al.*, 2004). Em câncer de mama, a expressão de VEGF-D está associada com HIF-1 $\alpha$  e há uma significativa correlação entre a presença de HIF-1 $\alpha$  e metástases linfáticas (Currie *et al.*, 2004; Katsuta *et al.*, 2005). Schoppmann *et al.* (2006) mostraram que a expressão de HIF-1 $\alpha$  está correlacionada com a linfangiogênese peritumoral em linfonodos acometidos por metástases de câncer de mama. Há evidências que o aumento da inflamação e a expressão de VEGF-C por células inflamatórias pode ter um papel crucial na linfangiogênese associada ao tumor (Coussens, 2002). O HIF-1 $\alpha$  também parece estar relacionado a expressão de VEGF-C e conseqüente linfangiogênese em carcinomas de boca, pulmão e coloretais, assim como metástases de câncer pancreático (Tao *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008; Simiantonaki *et al.*, 2008). A hipóxia também pode controlar a atividade de VEGF-D em células de musculares lisas em cultura (Teng *et al.*, 2002). Em conjunto, estes dados sugerem uma possível associação entre HIF-1 $\alpha$  e a produção de VEGF-C e VEGF-D, linfangiogênese e metástases linfáticas.

Para verificar a hipótese de que a produção de VEGF-C e -D pudesse ser responsável pelo aumento observado na extensão/densidade da rede linfática, avaliamos a produção de VEGFR-3 e FASN em um subgrupo de tumores e linfonodos tratados ou não com orlistat. Conforme já descrito na literatura (Carvalho *et al.*, 2008), os níveis protéicos de FASN em melanomas intraperitoneais experimentais de camundongos aumentaram com a sua inibição, pois a falta de atividade pode ter gerado como resposta um aumento na transcrição ou mesmo a estabilização da proteína FASN, com aumento da sua meia-vida. Os resultados de western blotting descritos no presente trabalho

mostraram também que não houve um padrão de expressão nítido, e aparentemente, nenhuma correlação entre a expressão destas proteínas. Observamos, entretanto, uma maior quantidade da proteína FASN nos tumores primários dos animais tratados com orlistat, quando comparados ao grupo controle, e menor produção de VEGFR-3 nos tumores primários dos animais que receberam tratamento com orlistat. Com relação a estes dados, é importante ressaltar que nossos extratos protéicos foram feitos a partir do tecido como um todo, o que inclui tanto proteínas intratumorais como peritumorais, bem como proteínas do estroma e eventualmente de células inflamatórias. Tendo-se em vista que houve um evidente aumento na densidade linfática associada a feridas cirúrgicas e aos tumores em nossos experimentos, estamos considerando a utilização da técnica da microdissecção à laser, na qual apenas as proteínas das células tumorais ou de áreas ricamente vascularizadas seriam extraídas, melhorando a sensibilidade da detecção nas reações de western blotting. Além disso, de acordo com os dados da literatura que relacionam a expressão de VEGF-C e -D e HIF-1 $\alpha$ , avaliaremos através de reações de RT-PCR já padronizadas, os níveis dos RNAm destes fatores nas amostras de tumores e linfonodos dos grupos tratados e controle. Sem dúvida, o papel da hipóxia e do HIF-1 $\alpha$  neste modelo também necessita de maiores estudos.

Nossos dados mostram também que não houve diferença significativa entre as médias dos volumes dos tumores e linfonodos tratados ou não com orlistat, o que pode eventualmente ter sido consequência de variações inesperadas no procedimento de injeção das células no delicado tecido subcutâneo da orelha de camundongos. No entanto, apesar do aumento significativo da densidade dos vasos linfáticos, o volume dos linfonodos metastáticos foi menor no grupo tratado quando comparado ao grupo controle em dois dos experimentos realizados. Isto poderia ser explicado pelo fato de que vasos linfáticos neoformados apresentam eventualmente função deficiente.

Em resumo, os resultados apresentados mostram que a inibição da FASN pelo tratamento com orlistat aumentou a extensão e ramificação dos vasos

linfáticos das orelhas tanto dos camundongos Balb-C com feridas cirúrgicas como de camundongos C57Bl6 com melanomas experimentais. Mostram ainda que a inibição da FASN pode diminuir o volume de linfonodos metastáticos e a produção de VEGFR-3 nos tumores primários.

## ***7. CONCLUSÕES***

---

---

7.1. A linfangiogênese ao redor de feridas cirúrgicas e de melanomas experimentais em orelhas de camundongos Balb-C e C57Bl6, respectivamente, foi significativamente aumentada pela inibição da FASN com orlistat.

7.2. A média dos volumes dos tumores e linfonodos dos camundongos C57Bl6 não foi alterada pela inibição da FASN com orlistat.

7.3. A quantidade relativa da proteína FASN nos tumores primários e linfonodos metastáticos dos camundongos C57Bl6 é maior do que a da proteína VEGFR-3.

7.4. A quantidade da proteína FASN nos tumores primários é maior nos animais tratados com orlistat.

7.5. A quantidade da proteína VEGFR-3 é diminuída pela inibição da FASN, nos tumores primários.

7.6. Não foi observada correlação entre a quantidade das proteínas FASN e VEGFR-3 nos tumores ou linfonodos do grupo controle ou tratado.

## ***7. REFERÊNCIAS***

---

---

-Achen MG, Williams RA, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PAW et al. Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. *J. Pathol.* 2001 193, 147–15

-Achen MG, Stacker SA. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol.* 1998 Oct;79(5):255-65.

-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.

-Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita J et al. (2000) Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br. J. Cancer* 83, 887–891

-Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DM. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res.* 2005 Dec1;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.

-Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6 (3):185-93.

-Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8): 604-17.

-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, Jones RO The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2003 Jun;2(2):107-20.

-Bayer-Garner IB, Hough AJ Jr, Smoller BR. Vascular endothelial growth factor expression in malignant melanoma: prognostic versus diagnostic usefulness. *Mod Pathol*. 1999 Aug;12(8):770-4.

-Belágyi T, Zsoldos P, Makay R, Issekutz A, Oláh A. Multiorgan resection (including pancreas) for metastasis of cutaneous malignant melanoma. *Journal of the Pancreas* 2006; 7 (2): 234-240.

-Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Mar;76(3):1274-8.

-Bissell MJ, Labarge MA. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell*. 2005 Jan;7(1):17-23.

-Bissel P, Castagnoli N Jr, Penich S. Studies on the cytochrome P450 catalyzed oxidation of <sup>13</sup>C labeled 1-cyclopropyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by <sup>13</sup>C NMR. *Bioorg Med Chem*. 2005 Apr 15;13(8):2975-80.

-Bjordahl M, Cao R, Nisses LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, Zhou Z, Jackson D, Hansen AJ, Cao Y. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15593-8. Epub 2005 Oct 17.

-Boardman KC, Swartz MA. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis. *Circ Res*. 2003 Apr 18;92(7):801-8. Epub 2003 Mar 6

-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 448-454.

-Brink J, Ludtke ST, Yang Chao-Yuh, Gu Zei-Wei, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (1): 138-143.

-Brochez L, Naeyaert JM. Understanding the trends in melanoma incidence and mortality: where do we stand? *Eur J Dermatol.* 2000 Jan-Feb;10(1):71-5; quiz 76. Review.

-Brown NS, Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem J.* 1998 Aug 15;334 ( Pt 1):1-8

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

-Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Buto S., Collini P, Pilotti S, Pierotti MA. and Bongarzone I. (1999) Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am. J. Pathol.* 155, 1967–1976

-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 Jul 30;394(6692):485-90. Erratum in: *Nature* 1998 Oct 1;395(6701):525. Keshet E [corrected to Keshert E].

-Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):249-57. Review.

-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 Dec 1;123(11):2557-65.

-Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res.* 2004 Mar 19;94(5):664-70. Epub 2004 Jan 22.

-Chiarugi V, Magnelli L, Gallo O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis (review). *Int J Mol Med* 1998 Dec; 2 (6): 715-9.

-Chin L, Merlino G, DePinho RA. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes and Development* 1998; 12: 3467-3481.

-Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 2003; 3 (8): 559-570.

-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.

-Cho CH, SungHK, Kim KT, Cheon HG, Oh GT, et al. COMP-angiopoietin-1 promotes wound healing through enhanced angiogenesis, lymphangiogenesis, and blood flow in a diabetic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 28;103(13):4946-51.

-Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* 2005; 115: 813-824.

-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.

-Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. Review.

-Currie MJ, Hanrahan V, Gunningham SP, Morrin HR, Frampton C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1a) and the HIF-1a target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *Clin Pathol* 2004;57:829–834.

-Da MX, Wu Z, Tian HW. Tumor lymphangiogenesis and lymphangiogenic growth factors. *Arch Med Res*. 2008 May;39(4):365-72.

-Denko NC. Hypoxi, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. 2008 Sep;8(9):705-13.

-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.

-Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG et al. A Novel Prognostic Indicator for Cutaneous Melanoma Metastasis and Survival. *American Journal of Pathology*, Vol. 162, No. 6, June 2003

-Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, Van de Water L, Senger DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int. Arch. Allergy* 1995 May-Jun;107(1-3):233-5.

-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.

-Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brocker EB, Ruiter DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res.* 1997 Aug;7 Suppl 2:S19-26

-Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz-Friedman A, Garcia M. Transforming growth factor-beta 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblastic growth factor. *J Cell Physiol.* 1993 Jun; 155(3):595-605.

-Feldman ED, Pingpank JF, Alexander Jr. R. Regional treatment options for patients with ocular melanoma metastatic to the liver. *Annals of Surgical Oncology* 2004; 11 (3): 290-297.

-Fidler IJ. Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001 Apr;10(2):257-69, vii-viii. Review.

-Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 1971 Feb 1;133(2):275-88.

-Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, 1989 May 4;339(6219):58-61

-Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992 Jun 5;267(16):10931-4. Review.

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

-Franket AE, Gill PS. VEGF and myeloid leukemias. *Leuk Res*. 2004 Jul;28(7):675-7

-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.

-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.

-Giraud E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, Klagsbrun M, Ferrara N, Bussolino F. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998 Aug 21;273(34):22128-35.

-Graeven U, Andre N, Achilles E, Zornig C, Schmiegel W. Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1999 Oct;125(10):577-81.

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

-Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996 Aug 9;86(3):353-64. Review.

-Hawes D, Neville AM, Cote RJ. Occult metastasis. *Biomed Pharmacother* 2001; 55(4): 229-242. review

-Heemers H, Maes B, Fougere 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.

-He Y, Rajantie I, Ilmonen M, Makinen T, Karkkainen MJ, Haiko P, Salven P, Alitalo K. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3737-40.

-He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, Harding T, Jooss K, Takahashi T, Alitalo K. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res.* 2005 Jun 1;65(11):4739-46.

-Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood.* 2007 Feb 1;109(3):1010-7. Epub 2006 Oct 10.

-Hirorata S, Sakakibabara J. Angioneogenesis as a possible elusive triggering factor in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1999 Apr 17;353(9161):1331.

-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 Sep;180(3):1137-40. Epub 2008 Jul 18.

-Hoshida T, Isaka N, Hagendoorn J, di Tomaso E, Chen YL, Pytowski B, Fukumura D, Padera TP, Jain RK. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. *Cancer Res.* 66: 8065–8075.

-Hussein MR. Genetic pathways to melanoma tumorigenesis *J. Clin. Pathol.* 2004;57;797-801. Review

-Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr, Goldberg Ma. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 1;93(20):10595-9.

-Instituto Nacional de Câncer – Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2006, disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2006/> [acessado 2009 Fev. 04].

-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.

-Isaka N, Padera TP, Hagendoorn J, Fukumura D, Jain RK. Peritumor lymphatics induced by vascular endothelial growth factor-C exhibit abnormal function. *Can Res* 2004; 64, 4400–4404

-Jain RK, Fenton BT. Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *J Natl Cancer Inst* 2002;94:417–21.

-Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 1997 May 30;276(5317):1423-5. Erratum in: *Science* 1997 Jul 25;277(5325):463

-Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*. 2002 Jul;82(3):673-700. Review.

-Kajita T, Ohta Y, Kimura K, Tamura M, Tanaka Y, Tsunozuka Y, et al. The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 2001 85, 255–260

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

-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.

-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 Jan;5(1):74-80.

-Katsuta M, Miyashita M, Makino H, Nomura T, Shinji S, et al. Correlation of hypoxia inducible factor-1a with lymphatic metastasis via vascular endothelial growth factor-C in human esophageal cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 78 (2005) 123– 130

-Katz KA, Jonasch E, Hodi FS, Soiffer R, Kwitkiwski K, Sober AJ, Haluska FJ. Melanoma of unknown primary: experience at Massachusetts General Hospital and Dana-Farber Cancer Institute. *Melanoma Research* 2005; 15 (1): 77-82 review

-Kinoshita J, Kitamura A, Saeki H, Tanaka S, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2001 Mar;66(2):159-64.

-Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004 Mar 19;94(5):678-85.

-Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chem Biol*. 1999 Aug;6(8):R217-24.

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

-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.

-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.

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

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

-Kuhajda FP. Fatty acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2006; 16 (3): 202-208.

-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.

-Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci.* 2003 Apr;18:65-70. Review.

-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.

-Lacal PM, Failla CM, Pagani E, Odorisio T, Schietroma C, Falcinelli S, Zambruno G, D'Atri S. Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol.* 2000 Dec;115(6):1000-7.

-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.

-Lee ML, Tomsu K, Von Eschen KB. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. *Melanoma Research* 2000; 10(1): 81-92.

-Leiter U, Meier F, Schittek B, Garbe C. The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol* 2004; 86: 172-178.

-Liang KV, Sanderson SO, Nowakowski GS, Arora AS. Metastatic malignant melanoma of the gastrointestinal tract. *Mayo Clin Proc* 2006; 81 (4): 511-516.

-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 W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Lee CS et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Royal College of Pathologists of Australia (Pathology)* 2006; 38(4): 287-301.

-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 Mar;28(3):381-4. Chinese.

-Liu B, Wang Y, Fillgrove KL, Anderson VE. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002 Mar;49(3):187-93. Epub 2002 Jan 9.

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

-Lu Z, Gu Y, Rooney SA. Transcriptional regulation of the lung fatty acid synthase gene by glucocorticoid, thyroid hormone and transforming growth factor- $\beta$ 1. *Biochim Biophys Acta*, (2001) 1532: 213-222.

-Maddodi N, Setaluri V. Role of UV in cutaneous melanoma. *Photoch Photobio* 2008, 84: 528–536. Review.

-Mandriota SJ, Jussila M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. (2001).

-Marcoval J, Moreno A, Graells J, Vidal A, Escriba JM, Garcia-Ramirez M, Fabra A. Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. *J Cutan Pathol*. 1997 Apr;24(4):212-8.

-McWilliams RR, Rao RD, Brown PD, Link MJ, Buckner JC. Treatment options for brain metastases from melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005; 5 (5): 809-820. review

-Maxwell PH, Wiesener MS, Chang QW, Clifford SC, Vaux EC, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999 May 20;399(6733):271-5

-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 (may).

-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 Apr 1;94(5):857-63

-Menendez JA, Colomer R, Lupu R. Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? *Medical Hypotheses* 2005c; 64: 342-349.

-Menendez JA, Vellon L, Ruth L. Orlistat: From antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB2)-overexpressing gastrointestinal tumors? *Society Exp Biol Med* 2005d; 151-154.

-Menendez JA, Vellon L, Lupu R. The antiobesity drug Orlistat induces cytotoxic effects, suppresses Her-2/neu (erbB2) oncogene overexpression, and synergistically interacts with trastuzumab (Herceptin) in chemoresistant ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 219-221.

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

-Meyskens FL, Farmer P, Fruehauf JP. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 14: 148–154. 2001. Review.

-Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 1996; 49(1-3):117-37

-Mihm MC Jr, Clark WH Jr, Reed RJ. The clinical diagnosis of malignant melanoma. *Semin Oncol*. 1975 Jun;2(2):105-18.

-Moore BB, Arenberg DA, Addison CL, Keane MP, Polverini PJ, Strieter RM. CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis. *Angiogenesis*. 1998;2(2):123-34.

-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.

-Nagy JA, Feng D, Vasile E, Wong WH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Lab Invest*. 2006 Aug;86(8):767-80. Epub 2006 May 29.

-National Cancer Institute– Câncer Statistics: melanoma 2009, disponível em: URL: <http://www.cancer.gov/statistics> [acessado 2009 Fev. 04].

-Naumov GN, Asklen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle*. 2006 Aug; 5 (16): 1779-87.

-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.

-Norrby K. *J Cell Mol Med*. In vivo models of angiogenesis. 2006 Jul-Sep;10(3):588-612. Review.

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

-Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, McCarthy JE, Weich HA, Alitalo K, Wilting J. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol.* 1997 Aug 1;188(1):96-109.

-Ohta Y, Shridhar V, Bright RK, Kalemkerian GP, Du W, Carbone M, Watanabe Y, Pass HI. VEGF and VEGF type C play an important role in angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesothelioma tumours. *Br J Cancer.* 1999 Sep;81(1):54-61

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

-Ômura 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 Dec 1;13(23):7139-45. Epub 2007 Dec 3.

-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.

-Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic Metastasis in the Absence of Functional Intratumor Lymphatics. *Science* (2002); 296, 1883

-Papetti M, Herman M I. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 282: C947–C970.

-Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Apr;17(4):605-19. Review

-Perera Y, Farina HG, Hernández I, Mendoza O, Serrano JM, Reyes O, Gómez DE, Gómez RE, Acevedo BE, Alonso DF, Perea SE. Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. *Int J Cancer.* 2008 Jan 1;122(1):57-62.

-Perlis C, Herlyn M. Recent advances in melanoma biology. *Oncologist.* 2004;9(2):182-7.

-Pintavorn P, Ballermann BJ. TGF-beta and the endothelium during immune injury. *Kidney Int.* 1997 May; 51 (5): 1401-12.

-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 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.

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

-Pour P, Tantachamrum T, Althoff J, Mohr U. Melanoma in the north of Thailand in the last ten years. Report from Chiang Mai University. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol.* 1973;80(1):31-5.

-Reed JA, McNutt NS, Albino AP. Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression. *Am J Pathol.* 1994 Feb;144(2):329-36

-Redy MV, Faraco CD, Erickson CA. Specification and Migration of Melanoblasts at the Vagal Level and in Hyperpigmented Silkie Chickens. *Developmental Dynamics* 213:476–485 (1998)

-Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. The incidence of malignant melanoma in the United States: issues as we approach the 21st century. *J Am Acad Dermatol.* 1996; (34): 839-847.

-Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:73-91. Review.

-Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671-4. Review.

-Rodolfo M, Daniotti M, Vallacchi V. Genetic progression of metastatic melanoma. *Cancer Letters* 2004; 214: 133-147.

-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, v. 1, n. 10, p. 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.

-Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett*. 2006 May 22;580(12):2879-87. Epub 2006 Apr 17. Review.

-Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol*. 2004 Jul;25(7):387-95. Review.

-Salven P, Heikkilä P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 1997;76(7):930-4.

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

-Schirotta C, Cianfarani F, Licalo PM, Odorisio T, Orecchia A, Kanitakis J, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer* 2003 Aug 15;98(4):789-97.

-Schoppmann SF, Fenzl A, Schindl M, Bachleitner-Hofmann T, Nagy K, Gnant M, Horvat R, Jakesz R, Birner P. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  correlates with VEGF-C expression and lymphangiogenesis in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* (2006) 99:135–141

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

-Shah US, Dhir R, Gollin SM, Chandran UR, Lewis D, Acquafredda M, Pflug BR. Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2006 Apr;37(4):401-9. Epub 2006 Feb 7.

-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 Jul;453(1):57-67. Epub 2008 Jun 6.

-Skobe M, Detmar M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000 Dec;5(1):14-9. Review.

-Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M: Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001a, 7:192–198

-Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M: Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 2001b, 159:893–903

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

-Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG: VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001, 7:186–191

-Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J*. 2002 Jul;16(9):922-34. Review.

-Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. *Am J Pathol*. 2001 Jul;159(1):223-35.

-Streit M, Detmar M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3172-9. Review.

-Sturm RA, Teasdale RD, Box NF. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* 277 (2001) 49–62. Review.

-Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Ras Tech* 2001 Oct 15;55(2):92-9.

-Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Research* 1997a; 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, Foufelle 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.

-Taipale J, Makinen T, Arighi E, Karkkainen M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:85-96. Review.

-Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005 Sep;109(3):227-41. Review

-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.

-Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, Lyytikä J, Kotronen A, Pitkonen M, Abo-Ramadan U, Ylä-Herttua S, Petrova TV, Alitalo K. Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med*. 2007 Dec;13(12):1458-66.

-Tao J, Li T, Li K, Xiong J, Yang Z, Wu H, Wang C. Effect of HIF-1alpha on VEGF-C induced lymphangiogenesis and lymph nodes metastases of pancreatic cancer. *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2006;26(5):562-4

-Teng X, Li D, Johns RA. Hypoxia up-regulates mouse vascular endothelial growth factor D promoter activity in rat pulmonary microvascular smooth-muscle cells. *Chest*. 2002 Mar;121(3 Suppl):82S-83S

-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*, v. 285, n. 2, p. 217-223, 2001.

-Tran TNT, Schulman J, Fisher DE. UV and pigmentation: molecular mechanisms and social controversies. *Pigment Cell Melanoma Res*. 21; 509–516

-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

-Ucuzian AA, Greisler HP. In vitro models of angiogenesis. *World J Surg* (2007) 31: 654–663

-Utikal J, Udart M, Leiter U, Peter RU, Krahn G *et al.* Additional cyclin D(1) gene copies associated with chromosome 11 aberrations in cutaneous malignant melanoma. *Int J Oncology* 2005; 26: 597-605.

- Vailhé B, Vittet D, Feige JJ. *In Vitro* Models of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Lab Inv* 2001 Vol. 81, No. 4, p. 439.

-Van de Sande, T., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G. & 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.

-Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, *et al.* Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001 Mar 15;20(6):1223-31.

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

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

-Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22: 157-163.

-Wang Y, Kuhajda FP, Li JN, Pizer ES, Han WF, Sokoll LJ *et al.* Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell cultures supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett.* 2001a; 167(1): 99-104.

-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

-Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003 Jan;22(1):1-29. Review.

-Witte MH, Way DL, Witte CL, Bernas M Lymphangiogenesis: mechanisms, significance and clinical implications. *EXS.* 1997;79:65-112. Review.

-Witte MH, Bernas MJ, Martin CP, Witte CL. Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc Res Tech* 2001 Oct 15;55(2):122-45.

-Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Ohoyama S, Sugiyama K and Sasaki T. (1999) Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* 5, 1823–1829.

-Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, et al., Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 1997 Jul;17(7):4015-23

-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 Nov;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 antiglioma therapy. *British Journal of Cancer* (2006) 95, 869 – 878

-Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*. 2004 Feb 6;94(2):230-8. Epub 2003 Dec 4.

## ANEXO



UNICAMP



CEEA/Unicamp

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

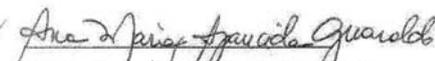
#### CERTIFICADO

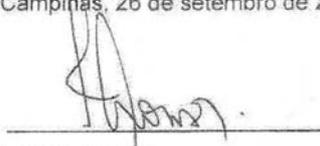
Certificamos que o Protocolo nº 1333-1, sobre "Efeitos da inibição da atividade de FAZ sobre a processo de linfangiogênese em modelo murino", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edgard Graner / Débora Campanella Bastos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 26 de setembro de 2007.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1333-1, entitled "Effects of the inhibition of FAZ activity on the lymphangiogenesis in mouse model", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 26, 2007.

Campinas, 26 de setembro de 2007.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Gueraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
Telefax: (19) 3521-6356  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>