

FRANCO APARECIDO ROSSATO

**Avaliação da morte celular induzida por
inibidores da enzima ácido graxo sintase em
linhagem celular derivada de melanoblastos
não tumorigênicos de camundongos**

CAMPINAS

2010

FRANCO APARECIDO ROSSATO

**Avaliação da morte celular induzida por inibidores da enzima
ácido graxo sintase em linhagem celular derivada de
melanoblastos não tumorigênicos de camundongos**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANIBAL E. VERCESI

COLABORADORA: Prof^ª. Dr^ª. KARINA GOTTARDELLO ZECCHIN

CAMPINAS

2010

III

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R733a Rossato, Franco Aparecido
Avaliação da morte celular induzida por inibidores da enzima ácido graxo sintase em linhagem celular derivada de melanoblastos não tumorigênicos de camundongos / Franco Aparecido Rossato. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores : Aníbal Eugênio Vercesi; Karina Gottardello Zecchin
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Melanócitos. 2. Apoptose. 3. Complexo ácido graxo sintetase. 4. Inibidores da síntese de ácidos graxos. 5. Mitocôndrias. I. Vercesi, Aníbal Eugênio. II. Zecchin, Karina Gottardello. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Non-tumorigenic melanocyte cell death induced by fatty acid synthase inhibitors

- Keywords:**
- Melanocytes
 - Apoptosis
 - Fatty acid synthetase complex
 - Fatty acid synthesis inhibitors
 - Mitochondria

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica
Área de Concentração : Biologia Estrutural,Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:


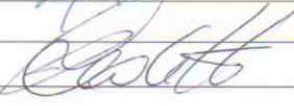

Prof^o. Dr^o. Aníbal Eugênio Vercesi
Prof^a. Dr^a. Nadja Cristhina de Souza Pinto Lardner
Prof^o. Dr^o. Ricardo Della Coletta

Data da defesa: 23-02-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Franco Aparecido Rossato

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Aníbal Eugênio Vercesi

Membros:	
Professor(a) Doutor(a) Aníbal Eugênio Vercesi	
Professor(a) Doutor(a) Ricardo Della Coletta	
Professor(a) Doutor(a) Nadja Cristhina de Souza Pinto Lardner	

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/02/2010

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Fisiopatologia Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, e colaboração da Professora Dra. Karina Gottardello Zecchin, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Campinas (FAEPEX-Unicamp).

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Asmíria e Valdir, pelo apoio incondicional e por serem em minha vida referências de dedicação e determinação.

Ao meu irmão Cristiano, sempre ao meu lado compartilhando suas experiências.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, meu profundo respeito e gratidão, por conceder a oportunidade da minha integração em seu grupo de pesquisa, possibilitando a realização deste trabalho.

Sou muito grato a Profa. Dra. Karina Gottardello Zecchin, grande exemplo de pesquisadora, na qual ajudou em muito no andamento deste trabalho, sempre me incentivando de maneira tranqüila, serena e objetiva.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro concedido ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, processo número 06/59786-0.

Ao Prof. Dr. Fernando Costa coordenador dos cursos de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Fernando Cendes, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica.

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

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Della Colleta, por gentilmente fornecer a linhagem HaCaT, como reagentes utilizados no silenciamento de FASN e nos experimentos de western blot.

Ao Prof. Dr. Roger Castilho, pelas sugestões e análises críticas.

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

À Profa. Dra. Luciane Carla Alberici pelo auxílio nos experimentos do consumo de oxigênio e potencial de membrana mitocondrial.

À Rose Mara Ortega, pela realização dos experimentos de corrida dos géis (western blot).

Aos amigos Carlos, Paolo e Leandro pela integração, amizade, e os grandes momentos vividos no futebol de final de semana.

À Carina por sempre estar disposta a ajudar.

A todos alunos integrantes do laboratório de Bioenergética: Mariana, Juliana, Rute, Daniela, Paula, Ana Catarina, Thiago, Bruno, Felipe.

Aos funcionários do Laboratório Edilene, Elisângela, Roberto, Márcia e Carol.

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

“Concentre-se em conhecer, e não em acreditar”.

(Albert Einstein)

ÍNDICE:

	PÁG.
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1 - INTRODUÇÃO	19
1.1 - Ácido graxo sintase (FASN)	20
1.1.1 - Regulação da expressão de FASN	22
1.1.2 - Inibidores específicos da atividade de FASN	23
1.1.3 - Efeitos biológicos da inibição de FASN	24
1.1.4 - Efeitos dos inibidores de FASN em células não tumorais	25
1.2 - Mitocôndrias	27
1.3 - Morte celular e disfunção mitocondrial	30
2 - OBJETIVOS	36
2.1 - Objetivo geral	37
2.2 - Objetivos específicos	37
3 - MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 - Cultura das células melan-a	39
3.2 - Cultura das células HaCaT	39
3.3 - Preparo da solução de cerulenina	40
3.4 - Preparo da solução de orlistat	40
3.5 - Ensaio de inviabilidade por azul de tripan	40
3.6 - Ensaio de viabilidade celular por MTT	41
3.7 - Citometria de fluxo	41
3.8 - Avaliação das taxas de morte celular	41
3.9 - Avaliação do ciclo celular	42
3.10 - Envolvimento de p53 na morte celular por apoptose	42
3.11 - Estimativa dos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs)	43
3.12 - Ativação de caspase	43
3.13 - Liberação de citocromo c	43
3.14 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	44
3.15 - Respiração celular	44
3.16 - Western blotting para detecção dos níveis de FASN	45
3.17 - Silenciamento de FASN	46

3.18 - Forma de análise dos dados	47
4 - RESULTADOS	48
5 - DISCUSSÃO	68
6 - CONCLUSÕES	74
7 - REFERÊNCIAS	76

LISTA DE FIGURAS

		PÁG.
Figura 1	Demonstração estequiométrica da ácido graxo sintase.	20
Figura 2	Representação do complexo enzimático de FASN.	21
Figura 3	Esquema simplificado da cadeia respiratória e da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria.	29
Figura 4	Vias de apoptose.	33
Figura 5	Curva de proliferação das células melan-a segundo o tempo, em horas.	49
Figura 6	A inibição de FASN com cerulenina reduz a viabilidade das células de melan-a.	51
Figura 7	A inibição de FASN com orlistat reduz a viabilidade das células de melan-a.	53
Figura 8	O tratamento com cerulenina, mas não orlistat, reduz a proliferação das células melan-a.	54
Figura 9	A apoptose induzida por orlistat e cerulenina nas células melan-a não é precedida por aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs).	56
Figura 10	O tratamento com inibidores de FASN induz discreta liberação de citocromo c.	57
Figura 11	A morte induzida pela inibição de FASN é acompanhada por ativação de caspase-3.	58
Figura 12	A apoptose induzida pela inibição de FASN em células melan-a é independente da ativação de p53.	59
Figura 13	O silenciamento de FASN não induz morte celular em melanoblastos não tumorigênicos, melan-a.	60

Figura 14	O tratamento com inibidores de FASN diminui o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células melan-a.	61
Figura 15	Inibição da respiração das células melan-a por cerulenina ou orlistat.	62
Figura 16	As células melan-a apresentam 2,3 vezes mais FASN do que as células HaCaT.	63
Figura 17	A inibição de FASN com cerulenina reduz a viabilidade das células HaCaT.	64
Figura 18	A inibição de FASN com orlistat reduz a viabilidade das células HaCaT.	66
Figura 19	A inibição de FASN com cerulenina ou orlistat reduz a proliferação das células HaCaT.	67

ABREVIATURAS

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

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

ADP - adenosina difosfato

AG - ácido graxo

ATCC - *American type culture collection*

ATP - adenosina trifosfato

AV - anexina V

BSA - albumina sérica bovina

Ca²⁺ - íon cálcio

CAT - carboxiatractilosídeo

CCCP - carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona

CoA - coenzima A

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

DMSO - di-metil sulfóxido

DNase - *deoxyribonuclease*

EGTA - glico- bis (â-aminoetil éter)-N,N,N',N'- ácido tetraacético

EROs - espécies reativas de oxigênio

FASN, FAS - ácido graxo sintase (*fatty acid synthase*)

FDA - *Food and Drug Administration*

FADH₂ - Flavina adenina dinucleotídeo reduzido

FITC - do inglês *fluorescein isothiocyanate*

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HEPES - *N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N' -[2-ethanesulfonic acid]*

kDa - Quilodaltons

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)

O₂^{•-} - radical superóxido

OH[•] - radical hidroxila reativo

PBS - solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PARP - *Poly(ADP-ribose) polymerase*

PFT - *pifithrin-alpha*

PI - iodeto de propideo (*propidium iodide*)

RNAi - *RNA interference*

RNase - *ribonuclease*

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Media 1640*

SDS - dodecil sulfato de sódio

SFB - soro fetal bovino

TPM - transição de permeabilidade mitocondrial

TPA - *12-*o*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate*

$\Delta\Psi$ - potencial elétrico de membrana

RESUMO

Ácido graxo sintase (FASN - EC 2.3.1.85) é a enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos de cadeia longa a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA. Diversos estudos mostram que a FASN é altamente expressa em vários tipos de neoplasias malignas humanas, tais como de próstata, mama, melanoma e, em alguns destes tumores, a alta expressão de FASN está associada a um pior prognóstico. O tratamento com inibidores específicos de FASN, como cerulenina, C75 e orlistat, diminui a capacidade de proliferação e induz apoptose em linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas de próstata, mama e cólon, porém pouco se sabe sobre os efeitos desses inibidores em células não tumorais. Recentemente mostramos que a inibição de FASN com orlistat reduz a proliferação e induz apoptose em células B16-F10 de melanoma murino (Carvalho et al. 2008). Considerando que (1) pouco é conhecido sobre os efeitos de inibidores de FASN em células “normais”, inclusive melanócitos e (2) dados iniciais mostram que o tratamento com orlistat ou cerulenina também induz elevados níveis de apoptose em células “normais”, este estudo teve por objetivo principal verificar os mecanismos envolvidos na morte induzida pela inibição da FASN em linhagem celular não-tumorigênica derivada de melanoblastos de camundongos (melan-a). O tratamento *in vitro* de células melan-a com 5 µg/mL de cerulenina ou com 30 µM de orlistat induziu expressiva porcentagem de apoptose, mas não necrose. As células tratadas também apresentaram redução da proliferação, além de discretas ativação de caspase-3 e liberação de citocromo c. Como o silenciamento de FASN através de RNA de interferência (RNAi) não resultou em apoptose, investigamos o possível envolvimento mitocondrial na morte induzida pelos inibidores de FASN. De fato, o tratamento com cerulenina ou orlistat resultou em diminuição do $\Delta\Psi_m$, além de mais de 50% de inibição da velocidade de respiração das melan-a no estado de repouso. Paralelamente também foi constatado que esses mesmos inibidores de FASN induzem apoptose e reduzem a proliferação de células derivadas de queratinócitos não tumorigênicos, HaCaT. O presente trabalho mostra, portanto, que os inibidores de FASN, cerulenina e orlistat, apresentam efeitos nocivos sobre células não tumorais, consequência da ação sobre a respiração mitocondrial.

ABSTRACT

Fatty acid synthase (FASN - EC 2.3.1.85) is the enzyme responsible for endogenous synthesis of long chain fatty acid palmitate derivative from precursors acetyl-CoA and malonyl-CoA. Studies have shown that FASN is highly expressed in several types of human malignancies, such as prostate, breast, melanoma, and in some of these tumors, high expression of FASN is associated with a poor prognosis. FASN inhibitors, such as cerulenin, C75, and orlistat, decrease cell proliferation and induce apoptosis in prostate, breast, and colon tumor cells lines. Recently we demonstrated that inhibition of FASN with orlistat reduced proliferation and induced apoptosis in cells B16-F10 murine melanoma (Carvalho et al. 2008). Consider that (1) little is known about the effects of FASN inhibitors in normal cells, including melanocytes and (2) previous data show that treatment with orlistat or cerulenin also induces high levels of apoptosis in normal cells, the aim of this study was to analyze the mechanisms involved in FASN inhibition-induced cell death in cell line derived from non-tumorigenic mice melanoblasts (melan-a). *In vitro* treatment of melan-a cells with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cerulenin or 30 μM orlistat induced a significant percentage of apoptosis, but not necrosis. Treated cells also showed reduced proliferation, and moderate activation of caspase-3 and release of cytochrome c. As FASN silencing through RNA interference (RNAi) did not result in apoptosis, we investigated the possible involvement of mitochondria in FASN inhibition-induced cell death. Cerulenin or orlistat treatment of melan-a cells decreased $\Delta\Psi_m$ and inhibited more than 50% the respiration rate in rest state. We also detected significant apoptosis and reduced proliferation in cells derived from non-tumorigenic keratinocyte, HaCaT, after incubation with the same FASN inhibitors. In conclusion, this study shows that FASN inhibitors, cerulenin and orlistat, have adverse effects on non-tumor cells, as a consequence of direct action on mitochondrial respiration.

INTRODUÇÃO

1.1. Ácido graxo sintase (FASN)

A ácido graxo sintase (*fatty acid synthase* – FASN, EC.3.1.85) é a enzima metabólica responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa, especialmente palmitato, a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA (**Fig. 1**) (Stoops e Wakil 1981, Tsukamoto et al. 1983, Kuhajda et al. 2000, Chirala et al. 2001, Rangan et al. 2001, Baron et al. 2004).

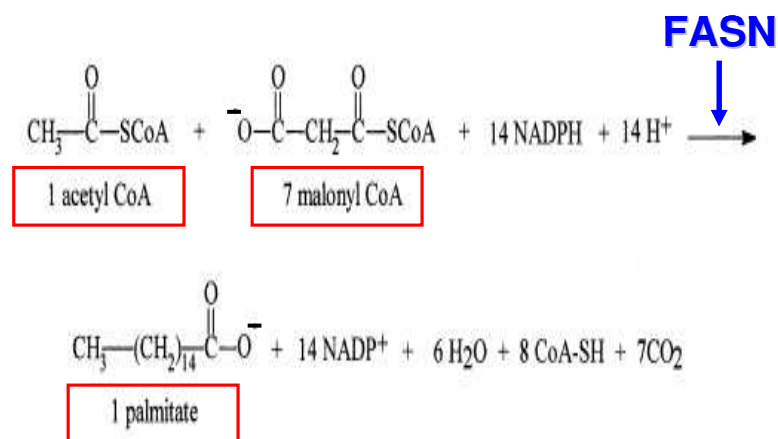
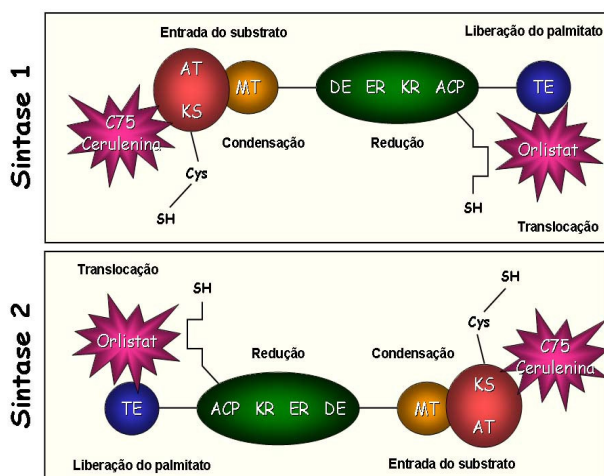
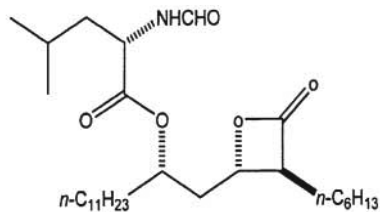


Fig. 1 – Demonstração estequiométrica de FASN, onde apenas um único acetil CoA é condensado pela enzima com malonil CoA, resultando na formação de uma cadeia de dois carbonos. Para a produção final de palmitato, a adição de seis moléculas de malonil-CoA na cadeia em crescimento se faz necessária. Os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

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



Orlistat (tetrahidrolipstatina, Xenical®)



Cerulenina. ([2R, 3S], -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida)

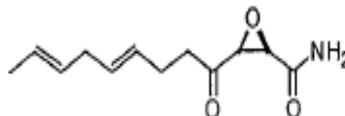


Fig. 2. Representação do complexo enzimático de FASN e seus sítios de inibição pelas drogas cerulenina, C75 e Orlistat. Sítios de FASN: β -cetoacil sintase (KS – *ketoacyl synthase*), acetil-CoA (AT – *acetyl transferase*) e malonil-CoA transacilases (MT – *malonyl transferase*), desidratase (DE – *dehydratase*),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

FASN tem grande participação na formação de membranas celulares, uma vez que produz componentes como ácidos graxos e seus derivados (Chirala et al. 2003). Os ácidos graxos e seus derivados são responsáveis por uma série de funções no organismo, agindo principalmente como mensageiros intracelulares e como forma armazenadora de energia (Kumar-Sinha et al. 2003). A expressão de FASN na maioria dos tecidos normais é baixa ou até mesmo ausente, exceto em fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões dos recém-nascidos (Kuhajda et al. 2000, Kusakabe et al. 2000, Chirala et al. 2001). A atividade alta de FASN em tecidos normais é uma exceção dos tecidos altamente lipogênicos, uma vez que na maioria dos tecidos normais a atividade dessa enzima é baixa, pelo fato da maior parte do fornecimento de ácidos graxos para a célula ser originário da dieta (Weiss et al. 1986, Baron et al. 2004, Menendez et al. 2005a). Por outro lado, o oposto é verificado em células neoplásicas malignas, onde a maior parte dos ácidos graxos provém da síntese endógena. Diversos são os tumores que apresentam aumento da atividade desta enzima: carcinoma de mama (Milgraum et al. 1997), de ovário (Alo et al. 2000), de próstata (Swinnen et al. 2002), de

endométrio (Pizer et al. 1998), de tireóide (Vlad et al. 1999), de pulmão (Piyathilake et al. 2000), de cólon (Visca et al. 1999), de esôfago (Nemoto et al. 2001), de estômago (Kusakabe et al. 2002), de bexiga (Visca et al. 2003), carcinoma espinocelular bucal (Krontiras et al. 1999, Agostini et al. 2004, Silva et al. 2004), melanoma (Innocenzi et al. 2003, Kapur et al. 2005) e sarcomas de tecidos moles (Takahiro et al. 2003, Rossi et al. 2006). Além disso, vários trabalhos demonstram que a alta expressão de FASN em tumores malignos está associada a um pior prognóstico (Epstein et al. 1995, Gansler et al. 1997, Alo et al. 2000, Kuhajda 2000, Takahiro et al. 2003, Innocenzi et al. 2003, Rossi et al. 2003, Kapur et al. 2005, Liu et al. 2006, Rossi et al. 2006, Menendez et al. 2007).

1.1.1 Regulação da expressão de FASN

A expressão de FASN no fígado e no tecido adiposo é regulada pela dieta, através de hormônios como a insulina, glucagon, glicocorticóides e hormônio tireoideano T₃ (Fukuda et al. 1999). Nestes tecidos, a produção endógena de ácidos graxos é estimulada pela ingestão de carboidratos e inibida por ácidos graxos ou pelo jejum (Kersten 2001). No tecido adiposo estes efeitos são mediados por hormônios que têm o potencial de estimular (insulina) ou inibir (leptina) a lipogênese dependente de FASN. A insulina estimula a expressão de FASN fazendo com que o excesso de glicose seja estocado como gordura nos adipócitos, enquanto a leptina inibe a atividade de FASN em resposta ao excesso de gordura presente nos adipócitos (Fukuda et al. 1999). Nos hepatócitos, além da regulação hormonal descrita, a presença de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta leva à diminuição de SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein*), responsável pela regulação da síntese de colesterol (Horton 2002, Brown e Goldstein 1997, 1999). As SREBPs formam uma família de fatores de transcrição envolvidos na manutenção da homeostase do colesterol intracelular, no controle da síntese de ácidos graxos e na diferenciação de adipócitos (Briggs et al. 1993, Wang et al. 1993).

Em células neoplásicas, a maior parte dos ácidos graxos é proveniente da biossíntese endógena, de maneira praticamente independente da dieta (Ookhtens et al. 1984, Weiss et al. 1986, Menendez et al. 2005a). Desse modo, a regulação da expressão de

FASN tem sido extensivamente estudada em diversas neoplasias malignas humanas. Estrógeno, progesterona, andrógenos e o fator de crescimento epidérmico (EGF) estimulam a expressão de FASN em células de câncer de mama e de próstata (Kuhajda 2000, Swinnen et al. 2000, Lacasa et al. 2001), sendo que esta regulação parece estar associada ao aumento da expressão de SREBP, cuja forma ativa estimula regiões regulatórias do gene que codifica a FASN (Swinnen et al. 1997b, 2000, Heemers et al. 2001). Também foi demonstrada uma associação direta entre a oncoproteína ErbB2 e FASN, através da via PI-3K/Akt, que também atua sobre o promotor de FASN (Kumar-Sinha et al. 2003). Essa observação é importante, pois uma alta expressão e/ou amplificação de ErbB2 está associada com um pior prognóstico para câncer de mama (Yarden 2001, Kumar-Sinha et al. 2003, Ross et al. 2003). Além disso, a freqüente perda de função do gene supressor de tumor PTEN pode ativar a via PI-3K/Akt e desempenhar um papel importante na regulação de FASN em células neoplásicas (Van de Sande et al. 2002).

1.1.2 Inibidores específicos da atividade de FASN

Alguns agentes foram descritos como inibidores de FASN, como por exemplo, a cerulenina e seu análogo sintético C75, orlistat, triclosan e alguns polifenóis (Kuhajda et al. 2000, Li et al. 2001, Kridel et al. 2004, Lupu e Menendez 2006). A **cerulenina** ([2R, 3S], -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida) é um produto natural do fungo *Cephalosporium caerulens*, descoberto em 1960 por suas propriedades antifúngicas (Hata et al. 1960) e essa droga inibe irreversivelmente a atividade de FASN através da ligação covalente com o sítio ativo β -cetoacil sintase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (**Fig. 2**) (Kuhajda et al. 2000). Recentemente foi descrito que a droga **orlistat** (tetrahidrolipstatina, Xenical[®], Roche, EUA), um derivado semi-sintético da lipstatina, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) para o tratamento da obesidade por inibir irreversivelmente as lípases gástricas e pancreáticas no interior do trato gastrointestinal (Guerciolini 1997, Lupu e Menendez 2006), também age como inibidor específico e irreversível do sítio catalítico tioesterase de FASN, o qual é responsável pela liberação do palmitato pela ACP (**Fig. 2**) (Kridel et al. 2004, Menendez et al. 2005b).

1.1.3 Efeitos biológicos da inibição de FASN

Foi demonstrado previamente que o tratamento com cerulenina, C75 ou orlistat inibe a progressão do ciclo celular e induz morte celular em diversas neoplasias malignas humanas, tais como mama, próstata e estômago (Pizer et al. 1996a, 1996b, 1998, Furuya et al. 1997, Kuhajada et al. 2000, Li et al. 2001, Knowles et al. 2004, Kridel et al. 2004, Menendez et al. 2004, 2005a). Em estudo recente, demonstramos que a cerulenina é também capaz de inibir o crescimento de fibroblastos gengivais humanos normais em culturas primárias (Almeida et al. 2005), assim como o orlistat reduz a taxa de proliferação de células endoteliais de cordão umbilical humano (Browne et al. 2006), o que sugere uma forte associação entre o controle do ciclo celular e a atividade de FASN. Grande parte dos ácidos graxos produzidos pelas células tumorais é incorporada nos fosfolipídios de membrana e a síntese destes fosfolipídios é bloqueada quando há inibição da síntese de ácidos graxos (Jackowski et al. 2000, Menendez et al. 2005b). A biossíntese de fosfolipídios é maior entre as fases G1 e S do ciclo celular, quando a membrana praticamente dobra em massa, antes da divisão celular. Portanto, a inibição de FASN leva a um acúmulo das células na fase G1 provavelmente por inibir a síntese de ácidos graxos destinados à síntese de membranas celulares (Menendez et al. 2005b). Além de inibir a síntese de ácidos graxos, o tratamento com orlistat bloqueia o ciclo celular nas fases G0/G1, inibe a expressão de ErbB2 e aumenta os níveis da proteína supressora de tumor p27^{Kip1}, levando a apoptose (Menendez et al. 2004, 2005a). Nosso grupo demonstrou recentemente que, em células B16-F10 derivadas de melanoma murino, o tratamento com orlistat resultou em acúmulo da proteína p27^{Kip1}, que é uma das principais proteínas responsáveis pela repressão do ciclo celular nas fases G0/G1, ao mesmo tempo em que aumentou os níveis da proteína Skp2, responsável pela ubiquitinação e subsequente degradação proteossômica de p27^{Kip1} (Carvalho et al. 2008).

Os mecanismos pelos quais a inibição de FASN inibe a progressão do ciclo celular e induz apoptose não estão totalmente esclarecidos. Algumas hipóteses foram propostas e o envolvimento mitocondrial (*ver adiante*) está presente em partes deste processo. As informações disponíveis na literatura até o momento sugerem que a inibição de FASN leva a: **(1)** acúmulo do intermediário malonil-CoA que, por sua vez, inibe a enzima carnitina

palmitoiltransferase-1 da membrana mitocondrial, responsável pela transesterificação de acil-CoAs de cadeia longa em acil-carnitina, que então entra na mitocôndria para ser oxidada (Bandyopadhyay et al. 2006); (2) acúmulo de ceramida, relacionada com a indução da via extrínseca de apoptose (*ver adiante*) através dos receptores de morte (Bandyopadhyay et al. 2006); (3) aumento da expressão de genes pró-apoptóticos como Bax e Bak (Heiligttag et al. 2002, Liu et al. 2006); (4) clivagem de PARP (*Poly(ADP-ribose) polymerase*), enzima nuclear envolvida no reparo de DNA e ativada na presença de danos no material genético (Menendez et al. 2005b); (5) aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs, *ver adiante*) e perda do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$, *ver adiante*) (Chajes et al. 2006); (6) liberação de citocromo c e conseqüente ativação de caspases (Heiligttag et al. 2002, Liu et al. 2006); (7) envolvimento do gene supressor de tumor p53 (Li et al. 2001); e (8) inibição da ativação de PI3K/Akt (Van de Sande et al. 2002, Liu et al. 2006).

1.1.4. Efeitos dos inibidores de FASN em células não tumorais

Como descrito anteriormente, vários são os trabalhos que mostram os efeitos de inibidores de FASN em células tumorais, entretanto são poucos os trabalhos que reportam os efeitos de tais inibidores em células não tumorais (Almeida et al. 2005; Browne et al. 2006; Silva et al. 2008). Em células tumorais, a inibição de FASN resulta em inibição da proliferação e morte celular por apoptose, fazendo desta enzima um importante alvo terapêutico no combate ao câncer (Furuya et al. 1997, Pizer et al. 1998, Li et al. 2001, Zhou et al. 2007). Por outro lado, a literatura sugere que as células “normais” são mais resistentes à ação citotóxica dos inibidores de FASN (Pizer et al. 1996, Zhang et al. 2005, Pizer et al. 2000a; 2000b). Além disso, os inibidores de FASN tem mostrado efeito anti-tumoral significativo, sem apresentar toxicidade para a proliferação de tecidos normais como medula óssea, pele, fígado e trato gastrointestinal (Pizer et al. 2000a; 2000b).

Pizer et al. (1996) mostraram que o tratamento com 5 µg/mL de cerulenina por 72 h inibe o crescimento de células humanas OVCAR-3 de câncer de ovário, mas não de linhagem celular controle, derivada de fibroblastos de pele humana (JW, *Non transformed*

Human Skin Fibroblasts Line). O crescimento de fibroblastos derivados de cultura primária de gengiva de indivíduos normais não foi alterado após o tratamento com 2,5 µg/mL de cerulenina, em comparação com células TCA-83 de carcinoma espinocelular de língua (Zhang et al. 2005). Helligtag et al. (2002) mostraram que tanto fibroblastos (NHLF, *Normal Human Lung Fibroblasts*), quanto queratinócitos (NHEK, *Normal Human Epidermal Keratinocytes*) normais humanos são resistentes aos efeitos apoptóticos da cerulenina, mesmo em células tratadas com 15 µg/mL da droga. Zhao et al. (2006), demonstraram que a toxicidade da cerulenina é seletiva para células de glioma humano, uma vez que as mesmas apresentaram diminuição da viabilidade celular, enquanto astrócitos normais, derivados de cultura primária de ratos, permaneceram inalterados após o tratamento.

Células normais derivadas de epitélio bovino não apresentaram nenhum efeito após tratamento com orlistat, mesmo em altas concentrações (200 a 500 µM), diferentemente de células NUGC-3 de câncer gástrico humano, as quais sofreram autofagia transitória, no período de 2 h (Dowling et al. 2009). Por outro lado, Browne et al. (2006) mostraram efeitos antiproliferativos de baixas concentrações (~1 – 5 µM) de orlistat em linhagem HUVEC de células endoteliais normais. Nesse estudo, orlistat primeiramente inibiu a proliferação após 24 h de tratamento, resultando em apoptose no período posterior analisado, de 48 h.

Apesar dos trabalhos acima mostrarem que o tratamento com inibidores de FASN não apresenta efeitos significativos de morte celular e/ou redução do crescimento em células “normais”, em trabalho recente da literatura, a cerulenina reduziu significativamente a proliferação de fibroblastos normais em culturas primárias (Almeida et al. 2005), o que sugere que a produção endógena de ácidos graxos não seja essencial somente para as células malignas.

1.2. Mitocôndrias

As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela conversão de energia de oxido-redução em energia química utilizável pelos processos celulares. Elas estão presentes em quase todas as células eucarióticas animais e vegetais, tendo dimensões da ordem de grandeza de 1 μm . Estruturalmente são constituídas por duas membranas e dois compartimentos por elas limitados. O compartimento mais interno, delimitado pela membrana mitocondrial interna, é denominado de matriz mitocondrial e contém enzimas do ciclo de Krebs, da β -oxidação de ácidos graxos, da oxidação de aminoácidos, o complexo piruvato desidrogenase e muitas outras enzimas. O segundo compartimento, cujo volume é diminuto, é denominado espaço intermembranar por estar localizado entre as membranas interna e externa. (Vercesi, 2003).

A membrana mitocondrial externa é permeável a pequenas moléculas e íons que se movem livremente através de canais transmembranas formados por uma família de proteínas integrais de membranas chamadas porinas (Lehninger, 2004). A membrana interna é impermeável à maioria das moléculas pequenas e a íons, incluindo prótons (H^+), sendo permeável somente a O_2 , CO_2 , NO e H_2O . As únicas espécies que atravessam a membrana interna são aquelas para as quais existem transportadores específicos, como por exemplo, ATP^4 , ADP^3 , piruvato, Ca^{2+} entre outros. É na membrana interna que se encontram os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase (Nicholls e Ferguson, 2002).

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

Normalmente, elétrons provenientes das coenzimas NADH, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos a NADH desidrogenase (complexo I, **Fig. 3**). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada

da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH₂). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. Em alguns tecidos a coenzima Q pode também ser reduzida pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxireductase (como resultado da β-oxidação de ácidos graxos). A UQH₂ é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH[•]), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos separados de UQH[•], um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de UQH[•] são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o citocromo c. O citocromo c transfere elétrons à citocromo oxidase (complexo IV). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons ao oxigênio molecular, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (Nicholls e Ferguson, 2002).

Segundo Mitchell (1961), a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de H⁺ da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas, contra um gradiente de concentração. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a utilização desta energia. O componente elétrico ($\Delta\Psi$) deste potencial atinge valores de aproximadamente 180 mV, no estado de repouso, enquanto o componente químico (ΔpH) oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de H⁺ através da F₀F₁-ATP sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, estaria diretamente acoplado à produção de ATP a partir da fosforilação do ADP.

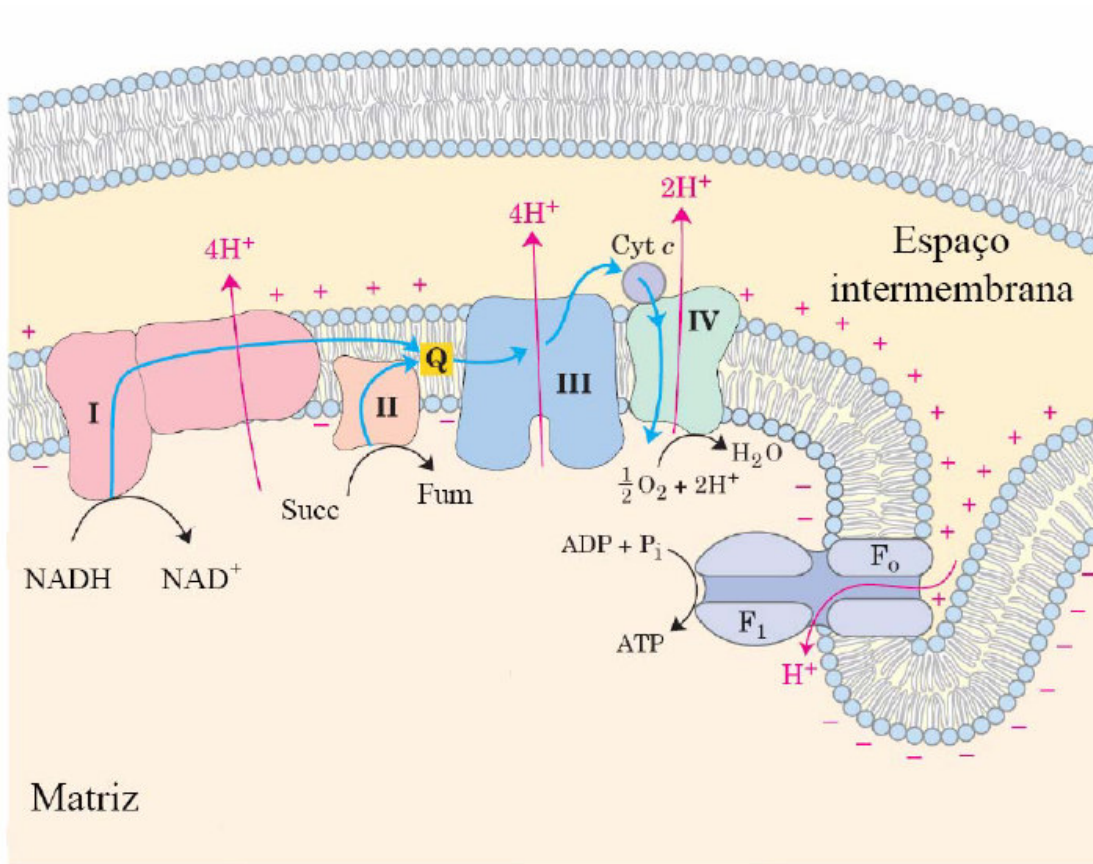


Fig. 3 Esquema simplificado da cadeia respiratória e da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria (modificado a partir de Nelson e Cox, 2004). Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto um gradiente químico (ΔpH) quanto elétrico ($\Delta \Psi$). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem retornar a matriz através de canais específicos de prótons (F_o) do complexo F_1F_o ATP sintase. A força próton-motora que impulsiona os prótons de volta para a matriz fornece a energia para a síntese do ATP, catalisada pelo complexo F_1 associado ao F_o .

A geração de um gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons ($\Delta \mu H^+$) é um elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente este mecanismo é fundamental, já que é aproveitado tanto na fosforilação oxidativa em

mitocôndrias quanto na fotossíntese de ATP em cloroplastos. Além disso, este gradiente pode ser usado diretamente para processos endergônicos sem a participação de ATP. São exemplos deste mecanismo de acoplamento direto as trocas eletroforéticas de ATP⁴⁺ por ADP³⁻ (Klingenberg e Nelson. 1994) e a captação eletroforética de Ca²⁺ que transporta duas cargas positivas ao interior da mitocôndria (Gunter et al. 1994).

A passagem de elétrons pela cadeia respiratória tem como consequência a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Cerca de 2% dos elétrons que entram na cadeia respiratória não são utilizados para reduzir O₂ à H₂O. Esses elétrons "perdidos" se combinam com o oxigênio em passos intermediários da cadeia respiratória, principalmente nos complexos I e III (Turrens 2003), promovendo a redução monoelétrica do O₂, gerando assim o radical superóxido (O₂^{•-}) (Boveris e Chance 1973, Liu 1997). As mitocôndrias possuem um sistema de defesa antioxidante que dismuta o O₂^{•-} a H₂O₂ sendo que este é altamente permeável por membranas biológicas, pode ser removido por antioxidantes. O H₂O₂ pode gerar HO[•] que é altamente reativo e citotóxico, sendo que a maior parte do HO[•] gerado, *in vivo*, provém da reação descrita a seguir chamada de reação de Fenton (H₂O₂ + Fe²⁺ → HO[•] + HO⁻ + Fe³⁺) (Halliwell e Gutteridge, 1992).

As EROs geradas na mitocôndria podem oxidar macromoléculas tanto na própria organela como em outros sítios intracelulares. Proteínas, principalmente da membrana mitocondrial interna, são alvos primários de danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Esses danos envolvem a formação de grupos carbonila e a oxidação de grupos tióis. Este último pode levar a permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), tornando-a gradativamente permeável a prótons, íons, suporte osmótico e pequenas proteínas de até 1500 Da (Kowaltowki et al. 2001).

1.3. Morte celular e Disfunção mitocondrial

A morte celular por apoptose difere da necrose com base em diversos aspectos bioquímicos e morfológicos. A apoptose está relacionada com insultos celulares mais amenos, que não resultam em inflamação e sua ativação depende da produção energia,

ATP, ativação de caspases e outros fatores pró apoptóticos. A morfologia da apoptose é caracterizada pela integridade das organelas celulares, incluindo a da mitocôndria, condensação da cromatina, fragmentação do DNA nuclear e formação de corpos apoptóticos. Por outro lado, a necrose está relacionada a intensas agressões nas células associadas com a inflamação, processo que resulta na queda da produção de ATP e ou lesão da membrana celular, morfológicamente caracterizada por: tumefação, rompimento celular e das organelas, particularmente das mitocôndrias, aparecimento de vacúolos, acidofilia citoplasmática e em suas etapas finais a necrose é responsável pela degradação total das células (McConkey 1998, Elmore 2007, Kroemer et. al. 2009).

Conforme citado anteriormente a inibição de FASN em células tumorais diminui a proliferação celular e induz morte celular por apoptose (Pizer et al. 1996a, 1996b, 1998, Furuya et al. 1997, Kuhajada et al. 2000, Li et al. 2001, Helligtag et al. 2002, Knowles et al. 2004, Kridel et al. 2004, Menendez et al. 2004, 2005c), sendo que na literatura não há relatos sobre inibição de FASN e indução de necrose.

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

A mitocôndria, organela conhecida como usina de energia da célula, exerce papel importante nos processos de vida, bem como participa de vias de desencadeamento de morte celular, através da liberação de agentes pró apoptóticos, como (a) citocromo c (Liu, et al.1996, Zimmermann et al, 2001, Ravagnan et al, 2002), (b) caspase 9 (Susin, et al. 1999a), (c) a proteína Smac/DIABLO, que inativa um grupo de proteínas citosólicas responsáveis pela inibição de caspases (Du et al, 2000, Verhagen et al, 2000, Ravagnan et al, 2002), (d) AIF (“apoptosis inducing factor”) (Zamzani et al. 1996 Lorenzo et al., 1999,

Van Loo et al., 2001, Ravagnan et al., 2002), (e) endonuclease G (Li et al. 2001), (f) proteínas que requerem alta temperatura (HtrA2) (Suzuki et al. 2001).

Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e sofisticados, envolvendo uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia. Até agora, pesquisas indicam que os mecanismos de apoptose são divididos em duas vias principais, a *extrínseca* ou via dependente de receptores de morte e a *intrínseca* ou via mitocondrial (**Fig. 3**). Estas duas vias ocorrem independentes, sendo que a interação de ambas também pode ocorrer “ver adiante” (Igney e Krammer, 2002, Takahashi et al. 2004). A via *intrínseca* ou mitocondrial pode ocorrer de duas maneiras, como descrito a seguir. Em resposta a estímulos pró-apoptóticos tais como (i) DNA danificado, (ii) inibidores de quinase e (iii) ativação de receptores da morte celular, a proteína Bad, da família Bcl-2, se liga ao complexo Bcl-2/Bcl-xl presente na membrana mitocondrial (Budihardjo et al. 1999, Polster e Fiskum 2004). Esta união promove a permeabilização da membrana externa pela formação de poros entre os dímeros de Bax (Datta et al. 1999, Gross et al. 1999). Dessa forma há efluxo mitocondrial de citocromo c e da proteína Apaf-1 para o citosol (Gross et al. 1999, Joza et al. 2001, Alirol e Martinou 2006). No citosol, citocromo c e Apaf-1 se ligam ao dímero Bcl-2/Bcl-xl, clivando a pró-caspase-9 e formando o apoptossomo, complexo de alto peso molecular responsável pela ativação de várias pró-caspases (Scorrano e Korsmeyer 2003, Kadenbach et al. 2004, Polster e Fiskum 2004, Green 2005, Garrido et al. 2006). Em seguida há uma seqüência de clivagens promovendo a ativação proteolítica de precursores inativos das caspases, culminando na morte celular programada (Hengartner 2000, Petronilli et al. 2001, Westphal e Kalthoff 2003, Scorrano e Korsmeyer 2003). Outra via mitocondrial de apoptose ocorre quando o efluxo de citocromo c é decorrente da formação da TPM, em condições em que há aumento da concentração intramitocondrial de Ca^{2+} , como descrito adiante (Scorrano e Korsmeyer 2003, Polster e Fiskum 2004).

Se por um lado a via *intrínseca* é desencadeada na mitocôndria, a via *extrínseca* tem início com a ativação dos receptores de morte (*death domains*), tais como Fas e TNF (fator de necrose tumoral), segue com a ativação da pró-caspase-8 (Kadenbach et al. 2004) e culmina com a ativação de caspases efetoras, como a caspase-3 (Takahashi et al. 2004, Polster e Fiskum 2004). A interação entre ambas as vias pode ocorrer quando a proteína

citossólica Bid, outra proteína da família Bcl-2, é clivada e translocada à mitocôndria, onde interage com a membrana e permite a liberação de citocromo c (Takahashi et al. 2004). Recentemente, verificou-se o envolvimento das mitocôndrias e caspases na apoptose induzida pela granzima B (Sutton et al. 2003, Goping et al. 2003).

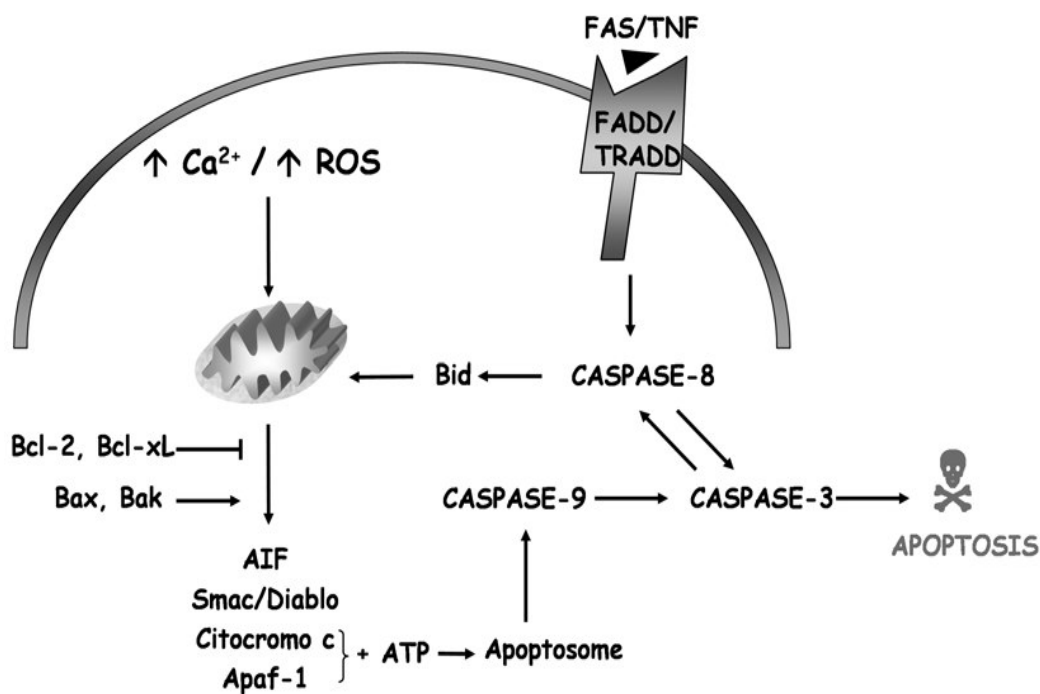


Fig. 4. Vias de apoptose. A via extrínseca pode ser iniciada após as interações de Fas ou TNF com seus respectivos domínios de morte FADD or TRADD. Esta via culmina na morte celular através da ativação de caspase-8 ou mediada por BID e subsequente apoptose dependente da via mitocondrial. A via intrínseca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

Várias condições que levam à lesão mitocondrial com comprometimento funcional, como peroxidação lipídica da membrana interna ou transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) causam morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (Green e Reed 1998, Kroemer et al. 1998, Lemasters et al. 1998, Crompton 1999, Fiers et al. 1999). A TPM é uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna, tipicamente promovida por estresse oxidativo e acúmulo excessivo de Ca^{2+} na matriz mitocondrial, num processo que pode ser estimulado ou inibido por uma variedade de compostos ou condições

(Zoratti e Szabo 1995, Lemasters et al. 1998, Crompton 1999, Kowaltowski et al. 2001, Gunter et al. 2004, Vercesi et al. 2006). Na TPM, a permeabilização da membrana mitocondrial interna resulta em perda de componentes da matriz mitocondrial, comprometimento da função mitocondrial e inchamento mitocondrial, com conseqüente ruptura da membrana mitocondrial externa e liberação de proteínas do espaço intermembranas (Zoratti e Szabo 1995, Green e Reed 1998, Lemasters et al. 1998, Crompton 1999, Kowaltowski et al. 2001, Green e Kroemer 2004).

As alterações de membrana que levam a TPM ainda não estão totalmente esclarecidas. A TPM claramente envolve proteínas de membrana e são prováveis componentes do poro de TPM: translocador de nucleotídeos de adenina, VDAC, ciclofilina D, hexoquinase, creatina quinase e o receptor de benzodiazepina (Beutner et al. 1998, Brdiczka et al. 1998, Halestrap et al. 2002). Trabalhos recentes indicam que pode ocorrer a formação do poro de TPM na ausência de translocador de nucleotídeos de adenina (Kokoszka et al. 2004) ou ciclofilina D (Basso et al. 2005), mas nestas condições, maiores concentrações de Ca^{2+} são necessárias.

A TPM é prevenida por redutores de tióis como o ditioneitol (Fagian et al. 1990), enquanto oxidantes de tióis promovem a TPM (Siliprandi et al. 1974, Fagian et al. 1990, Lenartowicz et al. 1991). Uma grande variedade de antioxidantes protege contra a TPM causada por condições distintas, sugerindo que este processo é o resultado de estresse oxidativo mitocondrial, mais especificamente, causado por espécies reativas de oxigênio (EROs) (Fagian et al. 1990, Valle et al. 1993, Castilho et al. 1996, Kowaltowski et al. 1996, 1998).

Considerando-se que:

- ✓ em estudo prévio mostramos que a inibição farmacológica de FASN induz apoptose em células B16-F10 de melanoma murino,
- ✓ como a alta expressão de FASN está associada a um pior prognóstico, seus inibidores têm sido vistos como possíveis agentes quimioterápicos,
- ✓ em estudo prévio mostramos que fibroblastos de gengiva normal mostraram redução da proliferação após inibição de FASN e

✓ pouco se sabe sobre os efeitos dos inibidores de FASN em células “normais”,

verificamos os mecanismos envolvidos na morte celular induzida pela inibição da FASN em linhagem celular não-tumorigênica derivada de melanoblastos de camundongos (melan-a).

OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

O presente trabalho visa caracterizar o possível envolvimento mitocondrial na apoptose decorrente do uso dos inibidores de FASN, orlistat e cerulenina, em células derivadas de melanoblastos de camundongo (melan-a).

2.2 - Objetivos específicos

2.2.1 - Avaliar a ação de cerulenina e orlistat sobre a proliferação e morte de células melan-a e HaCaT.

2.2.2 - Avaliar a participação de p53, ativação de caspase-3 e liberação de citocromo c na morte de células melan-a induzida pelos inibidores de FASN, cerulenina e orlistat.

2.2.3 - Avaliar o efeito do silenciamento de FASN, por RNAi, sobre a morte de células melan-a.

2.2.4 - Analisar os efeitos de cerulenina e orlistat na função mitocondrial de células melan-a através do monitoramento do potencial elétrico de membrana mitocondrial e do consumo de O₂.

MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 - Cultura das células melan-a:

A linhagem celular melan-a, derivada de melanoblasto de camundongo, foi gentilmente cedida pela Prof^a. Miriam Galvonas Jasiulionis (Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP). Estas células foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (TPP, Trasadingen, Suíça), em meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell), 200 nM de 12-*o*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 100 µg/mL de gentamicina (Vitrocell), 100 IU/mL de penicilina (Vitrocell) e 100 mg/mL de estreptomicina (Vitrocell), a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias, sempre se observando o pH do mesmo e a confluência das culturas, para que não houvesse falta de substratos, nem de ácidos graxos provenientes do meio de cultura e do SFB. As células utilizadas nos experimentos foram subcultivadas sempre que atingiram uma confluência de 70-80%, aproximadamente. Para isso, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) e então, incubadas a 37°C com tripsina a 2% e EDTA a 0,02%, em PBS. Após o completo descolamento das células (cerca de 1-5 min), a ação da tripsina foi interrompida pela adição de RPMI 1640 contendo 10% de SFB. As células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 4 min, ressuspensas em novo meio de cultura contendo 5% de SFB, contadas em hemocitômetro e plaqueadas em novos frascos plásticos. As células foram mantidas em nitrogênio líquido em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) e 90% de SFB. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as linhagens subcultivadas por, no máximo, dez passagens a cada descongelamento e então, descartadas.

3.2 - Cultura das células HaCaT:

A linhagem celular não tumorigênica HaCaT, derivada de queratinócitos humanos foi adquirida da *Cell Line Service* (CLS, Heidelberg, Alemanha). Estas células foram

cultivadas em meio de cultura DMEM contendo alta glicose (Vitrocell), 10% de SFB e antibióticos, da mesma maneira descrita para as células melan-a.

3.3 - Preparo da solução de cerulenina:

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

3.4 - Preparo da solução de orlistat:

O composto ativo do orlistat (Xenical[®], Roche, Suíça) foi extraído de acordo com Knowles et al. (2004). O conteúdo de 1 cápsula foi dissolvido em 1 mL de etanol absoluto, seguindo de agitação por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 12.000 xg por 5 min e o sobrenadante, com uma concentração estoque de 250 mM, foi estocado em pequenas alíquotas a -80°C até o momento do uso. As células do grupo controle foram tratadas com o mesmo volume de etanol absoluto.

3.5 - Ensaio de inviabilidade por azul de tripan:

Para avaliarmos os efeitos citotóxicos e antiproliferativos dos inibidores de FASN, cerulenina e orlistat, as células foram coradas com azul de tripan. Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 100 µL de meio de cultura contendo SFB . Cerca de 20 µL de células foram corados em 20 µL de azul de tripan 0,1% em PBS e contadas as células presentes em 4 quadrantes do hemocítômetro. Foram contabilizados o número total de células, o número de células viáveis (não coradas) e o número de células inviáveis (coradas em azul).

3.6 - Ensaio de viabilidade celular por MTT:

A porcentagem de células viáveis após tratamento com inibidores de FASN foi determinada usando *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT, Sigma), uma vez que células viáveis são capazes de reduzir o sal *tetrazolium*, de cor amarela, em formazan, de cor púrpura (Mosmann 1983). As células foram plaqueadas em placas de 6 poços ($2,5$ a $6,5 \times 10^4$ células/mL, padronizada para cada linhagem, segundo suas velocidades de duplicação). Após 24 h o meio de cultura foi trocado por meio fresco contendo diferentes concentrações de cerulenina ou orlistat. Após 24 h para cerulenina e 48 h para orlistat, o meio de cultivo foi aspirado e trocado por meio novo, contendo 0,3 mg/mL de MTT, na ausência de SFB. As células foram incubadas por 4 h, a 37°C em estufa de CO₂ (5%). Em seguida o meio foi removido e adicionado 1 mL de etanol absoluto, em cada poço, até a completa solubilização do formazan gerado. Em seguida, o conteúdo foi transferido para placas de 96 poços e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Bio-Rad, EUA) a 540 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação aos controles.

3.7 - Citometria de fluxo:

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

3.8 - Avaliação das taxas de morte celular:

A porcentagem de células em apoptose e necrose foi determinada por citometria de fluxo, em canais FL1 e FL2, após a marcação com Anexina V (Invitrogen, CA, EUA) e com 7-AAD (*7-Amino-actinomycin D*, Molecular Probes, Invitrogen), respectivamente. Após os tratamentos, as células foram incubadas com 0,2 µg/µL de Anexina V-FITC ou

com 20 µg/µL de 7-AAD em tampão de ligação contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂, no escuro, por 20 min, a temperatura ambiente e analisadas em citometria de fluxo.

3.9 - Avaliação do ciclo celular:

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços (2,5 a 6,5 x 10⁴ células/mL). Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco não suplementado, ou seja, na ausência de SFB, a fim de se promover o sincronismo (parada em G₀/G₁) das células. Após mais 24 h, o meio de cultura foi novamente trocado e as células foram tratadas com cerulenina por 24 h ou com orlistat por 48 h, na presença de meio de cultivo suplementado com SFB. Após os tratamentos as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 200 µL de etanol a 70% e armazenadas a -20°C por, no mínimo, 24 h. Após este período as células foram centrifugadas, ressuspensas em 200 µL de PBS com 10 µg/mL de RNase (Sigma) e incubadas a 37°C por 1 h. As células foram centrifugadas e marcadas com 50 µg/mL de iodeto de propídeo (200 µL) por 2 h a 4°C. Em seguida, as células foram lidas em canal FL2, em citômetro de fluxo e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o programa ModFit™ (Becton Dickinson, ME, EUA).

3.10 - Envolvimento de p53 na morte celular por apoptose:

As células foram plaqueadas e, após 24 h, foram pré-incubadas com 10 µM do inibidor sintético específico de p53 (Komarov et al. 1999), PFT (*pifithrin-alpha*), por 30 min. Em seguida, as células foram tratadas com 5 µg/mL de cerulenina por 24 h ou com 30 µM de orlistat por 48 h. Os índices de apoptose foram determinados em citometria de fluxo após marcação com anexina V-FITC (1:500), conforme descrito anteriormente.

3.11 - Estimativa dos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs):

As células melan-a foram plaqueadas ($4,75 \times 10^4$ /mL) em placas de 6 poços e, após 24 h de adesão, as células foram tratadas com 5 μ g/mL de cerulenina ou com 30 μ M de orlistat durante 6 h. Terminados os tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultivo sem SFB, e marcadas com 3 μ M de H₂DCF-DA (Molecular Probes) a 37°C por 45 min, para determinação dos níveis de EROs citosólicas, mais especificamente, peróxido de hidrogênio (LeBel et al. 1992) e lidas em citômetro de fluxo, em canal FL-1. Para quantificação das EROs mitocondriais, mais especificamente, superóxido, as células foram marcadas com 3 μ M de MitoSox (Molecular Probes) a 37°C por 10 min e lidas em canal FL-2 (Payne et al. 2007).

3.12 - Ativação de caspase-3:

Utilizamos o kit para detecção da ativação de caspase-3 da Calbiochem (Gibbstown, NJ, EUA), segundo instruções do fabricante. As células foram plaqueadas e, após 24 h, foram tratadas com cerulenina 5 μ g/mL por 24 h e com orlistat 30 μ M por 48 h, após os tratamentos, as células foram incubadas por 40 min a 37°C em estufa de CO₂ (5%), com o marcador FITC-DEVD-FMK, na concentração de 1:300, em meio de cultura não suplementado. Após este período, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão próprio para leituras em citômetro de fluxo, em canal FL1.

3.13 - Liberação de citocromo c:

A análise da porcentagem de citocromo c presente dentro das mitocôndrias das células melan-a, foi verificada em citometria de fluxo, segundo protocolo descrito por Campos et al. (2006). Após tratamento com 5 μ g/mL de cerulenina ou com 30 μ M de orlistat por 6 h, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio mitocondrial (125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM HEPES (pH 7,2), 0,5 mM de EGTA, 1 mM MgCl₂ e 2 mM de KH₂PO₄) suplementado com 1 mM de *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF), 1% de coquetel de inibidores de protease

(Sigma) e digitonina a uma concentração final de 0,0001%. Cada amostra foi homogeneizada a temperatura ambiente, com rápidas passagens em vórtex, até que os controles apresentassem cerca de 50 a 60% de inviabilidade em azul de tripan 0,1%. As células foram então centrifugadas a 1000 xg por 3 min, a 4°C e, em seguida, fixadas em 500 µL de paraformoldeído 3,7% por 20 min a temperatura ambiente. Após fixação, as células foram centrifugadas, lavadas em PBS e incubadas 15 min com 500 µL meio de ligação (SFB a 2%, azida sódica a 0,2% e Triton-X-100 a 0,5% em PBS), seguido de incubação com anticorpo primário contra citocromo c (1:500, 6H2.B4, Promega, WI, EUA), por 1 h a 4°C. Logo após as células foram lavadas e marcadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (1:200, Vector Laboratories, CA, EUA) e lidas em canal FL-1 em citômetro de fluxo.

3.14 - Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$):

Mudanças no $\Delta\Psi_m$ de células melan-a permeabilizadas com digitonina foram estimadas através da fluorescência do marcador Safranina O (Holden e Sze 1989) em espectrofotômetro Hitachi, modelo F-4500, com 495/586 nm de comprimento de onda de excitação/emissão, com *slit* de 5,0 nM. As células foram tratadas com 5 µg/mL de cerulenina por 24 h ou com 30 µM de orlistat por 48 h. Cerca de 2×10^6 células/mL foram permeabilizadas com 15 µM de digitonina em 2 mL meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 1 mM de magnésio, 65 mM de Tris-HCl (pH 7,2), 2,5 mM de Na_2HPO_4 , 50 µM de EGTA, 5 mM de succinato, 0,01 % de BSA, 5 mM de Safranina O e 1 µM de CCCP, mantidos sob agitação constante a 37°C.

3.15 - Respiração celular:

O consumo de oxigênio pelas melan-a após tratamento por 24 h com cerulenina (5 µg/mL) ou com orlistat por 48 h (30 µM) foi medido utilizando-se um eletrodo tipo Clark (Hansatech Instruments Limited, Norfolk, Reino Unido). Cerca de 2×10^6 células/mL foram adicionadas em 2 mL de meio de reação, contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10

mM de HEPES, 1 mM de magnésio, 65 mM de Tris-HCl (pH 7,2), 2,5 mM de Na₂HPO₄, 50 µM de EGTA, 0,01 % de BSA e substratos de complexo I: 2,0 mM de malato, 1,0 mM de α-cetoglutarato, 1,0 mM de piruvato e 1,0 mM de glutamato, em uma câmara de acrílico fechada equipada com agitador magnético. A temperatura foi mantida a 37°C. Nessa condição experimental, a concentração inicial de oxigênio é de 107,5 mmol O₂/mg/min (Robinson e Cooper 1970). As velocidades do consumo de O₂ foram avaliadas após a adição das células e de digitonina (15 µM), ADP (30 µM), CAT (5 µM) e CCCP (1 µM). A fosforilação oxidativa foi analisada pelo cálculo do controle respiratório (CR), razão entre as velocidades de consumo de oxigênio nos estados de respiração III e IV, ou seja, respiração de fosforilação e de repouso, respectivamente.

3.16 - Western blotting para detecção dos níveis de FASN:

Foram realizados extratos totais protéicos a partir de células melan-a e HaCaT não tratadas, conforme descrito por Zecchin et al. (2005). As células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² e soltas mecanicamente com *cell scraper* em PBS, quando atingiram 80% de confluência. As células foram imediatamente homogeneizadas em tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton-X, 20 mM de Tris (pH 8,0), 137 mM NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA (pH 8,0) e 1 mM de NaF. Os inibidores de proteinases PMSF (1 mM), inibidor de tripsina (*soybean trypsin inhibitor*) (0,1 mM), aprotinina (1 µg/mL) e leupeptina (1 µg/mL) foram adicionados ao tampão de lise imediatamente antes do uso. As células foram homogeneizadas no gelo por 30 min, agitadas a cada 10 min. Após este período, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4°C, o sobrenadante coletado e estocado a -80°C até o momento do uso. A quantificação das proteínas totais de cada extrato foi realizada a partir do método de Bradford (1976). Em seguida, quantidades iguais de proteína total (40 µg) foram homogeneizadas em tampão de amostra redutor 4x concentrado contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 125 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10% de glicerol, 0,001% azul de bromofenol e 2% de beta-mercaptoetanol. As proteínas foram desnaturadas a 100°C por 5 min e então separadas eletroforéticamente em SDS-PAGE a 6 e 12%, em tampão contendo 2,5 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 19 mM de

glicina e 0,3 mM de SDS. Em seguida, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 9,6 mM de glicina e 20% de metanol. A eficácia das transferências foi verificada através da coloração das membranas com o corante Ponceau S (Sigma), seguida por bloqueio em uma solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão 20 mM Tris-HCl (pH 7,6) contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20 (TBST) por 18 h a 4°C. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado: anti-FASN (BD Pharmigen, 1:3,000) ou anti-beta-actina (Sigma, 1:50,000), por 2 h a temperatura ambiente, sob agitação constante. Foram então realizadas quatro lavagens de 15 min cada com TBST, seguidas de incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech, EUA, 1:1,000), por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação constante. As membranas foram novamente lavadas com TBST, conforme descrito anteriormente. As reações foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando-se o kit de detecção ECL – Western Blotting Analysis System (Amersham, Reino Unido) e expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Kodak). Após secagem, as películas radiográficas foram digitalizadas e a densitometria óptica das bandas foi realizada pelo programa de computador NIH Scion Image (EUA) e os valores normalizados pela beta-actina.

3.17 - Silenciamento FASN:

Cerca de $3,25 \times 10^4$ células/mL foram plaqueadas, em placas de 6 poços de cultura, em RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil), suplementado com 5% de SFB (Vitrocell), 200 nM de TPA (Sigma), sem a presença de antibióticos. Após 24 h, as células foram transfectadas com 200 nM de anti-FASN *small interfering* RNA (siRNA) **Oligo 1:** 5' CAA TGA TGG CCA ACC GGC TCT CTT T 3' (Mus musculus FASN (NM_00798), correspondente para nucleotídeos **940-964**); **Oligo 2:** 5' TGG GAA GAC CCG AAC TCC AAG TTA T 3' (Mus musculus FASN (NM_00798), correspondente para nucleotídeos **3408-3432**); e **Oligo 3:** 5' CCT CTG GGC ATG GCT ATC TTC TTG A 3' (Mus musculus FASN (NM_00798), correspondente para nucleotídeos **5841-5865**); ou 200 nM do Oligo controle (Invitrogen *StealthTM RNAi Negative Control Duplexes*); com 2 µg/mL

Lipofectamina 2000 (Invitrogen), conforme descrito por Carvalho et al. (2008). As soluções contendo as seqüências de siRNA e Lipofectamina foram preparadas em OptiMEM (Gibco (Invitrogen)); adicionado apenas 2,4 g de bicarbonato de sódio para cada litro preparado, conforme recomendações do fabricante e depois misturadas mantidas por 20 min em temperatura ambiente. As células melan-a foram lavadas em PBS e então adicionado 900 µL de meio de cultura Opti-MEM em cada poço, sem SFB e antibióticos, sendo em seguida adicionados os complexos siRNA/lipofectamina. Após 4 h de transfecção, foram adicionados 500 µL de meio Opti-MEM suplementado com 3% de SFB e 200 nM de TPA, para que a concentração final de SFB ficasse a 1%. Quarenta e oito h após a transfecção, as células foram coletadas para a verificação da inibição da expressão de FASN através de western blotting.

3.18 - Forma de análise dos dados:

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

RESULTADOS

Inicialmente foi avaliada a proliferação das células melan-a através de curvas de crescimento, nas quais 35.000 células foram plaqueadas em 2 mL de meio contendo 5% de SFB e 200 nM de TPA. O número total de células foi contado em hemocitômetro, a cada 24 h, durante 6 dias. A **Fig. 5** mostra que as células melan-a são capazes de se proliferar nas condições experimentais descritas (Bennett et al. 1987).

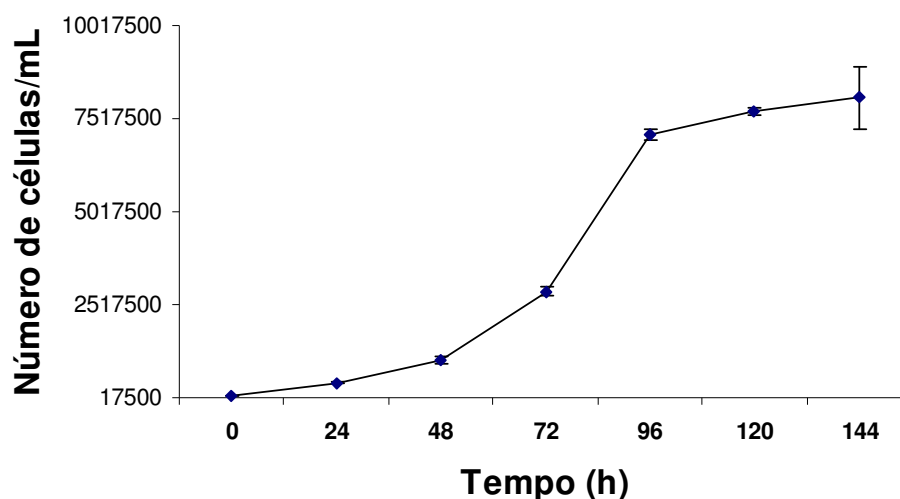


Fig. 5: Curva de proliferação das células melan-a segundo o tempo, em horas (h). Cerca de $1,75 \times 10^4$ /mL células melan-a foram plaqueadas e o número total de células foi contado em hemocitômetro a cada 24 h. Os valores representam a média \pm EPM de 4 experimentos distintos.

Em trabalho recente da literatura realizado por Carvalho et al. (2008), o conteúdo de FASN expresso em células melan-a foi demonstrado em experimento de western blotting, no entanto, a expressão de FASN apresentou-se em menores quantidades nas células melan-a quando comparadas com linhagens de células tumorais de melanoma.

Assim, sabendo que as células melan-a possuem a enzima FASN, foram verificados os efeitos de doses crescentes dos inibidores de FASN sobre a viabilidade, proliferação e morte celular de melanoblastos não tumorigênicos melan-a. A **Fig. 6** mostra que o tratamento com $2,5 \mu\text{g/mL}$ de cerulenina por 24 h inibe significativamente a proliferação das células melan-a, conforme observado pela redução do número de células totais (**Fig. 6 A**). O tratamento com cerulenina também resultou em morte celular, vista pela redução de células viáveis, assim como pelo aumento da porcentagem de células inviáveis (**Fig. 6 B-**

D). A **Fig. 6 E** mostra que a cerulenina induz morte celular por apoptose nas células melan-a. Também foram avaliados os índices de necrose após a marcação com 7-AAD (7-Amino-actinomycin D, Molecular Probes), porém os valores foram inferiores a 5% (dados não mostrados).

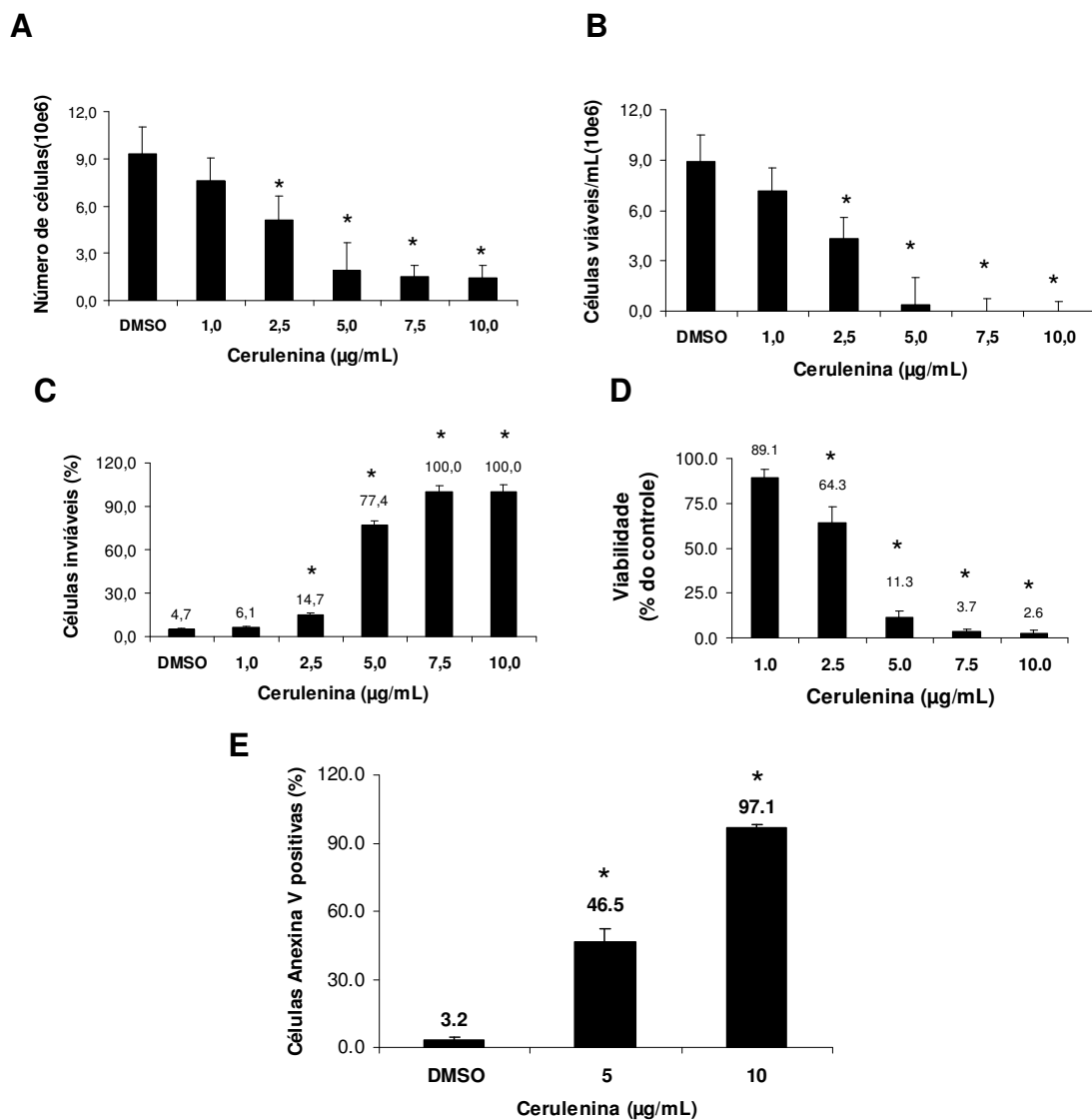


Fig. 6: A inibição de FASN com cerulenina reduz a viabilidade das células de melan-a. As células melan-a foram tratadas com doses crescentes de cerulenina por 24 h. Após o tratamento, o número de células totais (A), viáveis (B) e inviáveis (C) foi estimado pelo método do azul de tripan. As células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 100 µL de meio de cultura contendo 5% de SFB. Cerca de 20 µL de células foram corados em 20 µL de azul de tripan 0,1% e contadas as células presentes em 4 quadrantes de um hemocítômetro. Foram contabilizados o número total de células, o número de células viáveis (não coradas) e o número de células inviáveis (coradas em azul). A viabilidade celular também foi determinada por ensaio de MTT (D) e os índices de apoptose foram determinados após marcação com anexina V-FITC (1:500) (E). Os valores representam a média ± EPM de 6 experimentos distintos; * $p < 0,05$, cerulenina versus DMSO, teste *t* de Student.

Também foram avaliados os efeitos do tratamento com orlistat, outro conhecido inibidor de FASN, sobre a viabilidade e proliferação das células melan-a. A **Fig. 7** mostra que 30 μM de orlistat por 48 h inibe significativamente a proliferação das melan-a, conforme observado pela redução do número de células totais (**Fig. 7 A**). Assim como observado para cerulenina, a inibição de FASN com orlistat também resultou em redução de células viáveis, aumento da porcentagem de células inviáveis (**Fig. 7 B-D**) e em morte celular induzida por apoptose (**Fig. 7 E**). Desse modo, nossos dados demonstram inibição da proliferação celular e indução de morte celular em linhagem celular não tumorigênica após tratamento com inibidores de FASN. Assim como verificado para o tratamento com cerulenina, a administração de orlistat também não induziu níveis significativos de necrose (dados não mostrados).

Com base nesses resultados, as condições experimentais estabelecidas para os demais experimentos foram tratamentos com 5 $\mu\text{g/mL}$ de cerulenina por 24 h ou com 30 μM de orlistat por 48 h.

Foram realizados ensaios para medir a atividade de FASN (lipogênese) nas células melan-a após tratamento com inibidores de FASN, conforme descrito em Carvalho et al. (2008), utilizando como marcador radioativo, altamente sensível, a água triciada ($^3\text{H}_2\text{O}$). No entanto, como a atividade de FASN é muito baixa não conseguimos obter medidas significativas da atividade de FASN, mesmo nas células controle. Tais resultados, contudo, reforçam que os efeitos observados nas células melan-a são independentes da presença de ácidos graxos existentes no meio de cultura e no soro fetal bovino em que as células foram cultivadas.

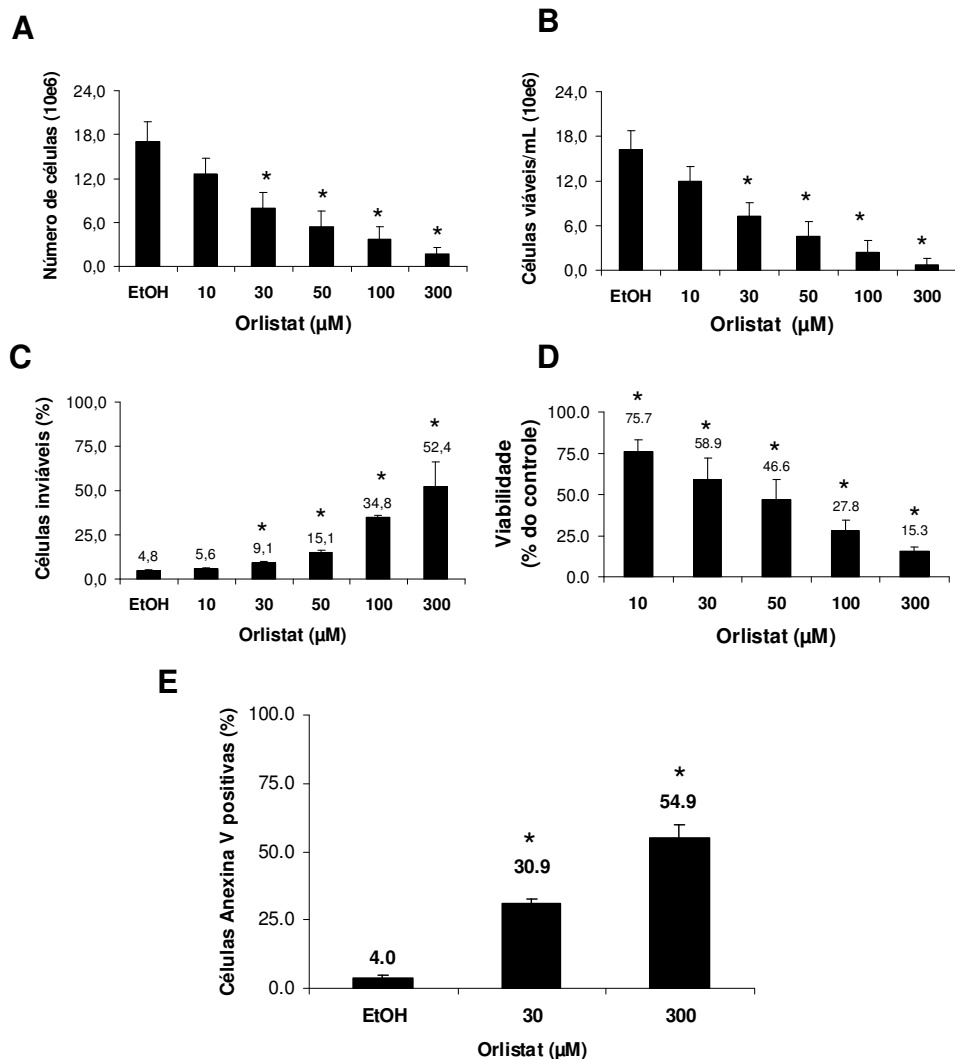


Fig. 7: A inibição de FASN com orlistat reduz a viabilidade das células de melan-a. As células melan-a foram tratadas com doses crescentes de orlistat por 48 h. Após o tratamento, o número de células totais (A), viáveis (B) e inviáveis (C) foi estimado pelo método do azul de tripan, as células foram lavadas em PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 100 μL de meio de cultura contendo 5% de SFB. Cerca de 20 μL de células foram corados em 20 μL de azul de tripan 0,1% e contadas as células presentes em 4 quadrantes de um hemocítômetro. Foram contabilizados o número total de células, o número de células viáveis (não coradas) e o número de células inviáveis (coradas em azul). A viabilidade celular também foi determinada por ensaio de MTT (D) e os índices de apoptose foram determinados após marcação com anexina V-FITC (1:500) (E), e a porcentagem de células em necrose foi determinada por citometria de fluxo, em canal FL2, após a marcação com 7-AAD (7-Amino-actinomycin D, Molecular Probes) onde os valores foram inferiores a 5% (dados não mostrados). Os valores representam a média ± EPM de 6 experimentos distintos; * $p < 0,05$, orlistat versus EtOH, teste t de Student.

A redução do número total de células após o tratamento com ambos os inibidores de FASN (**Fig. 6 A e 7 A**) sugere redução na proliferação celular. Desse modo, a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi avaliada, conforme descrito na metodologia. Para tanto, as células foram plaqueadas ($2,5$ a $6,5 \times 10^4$ células/mL), carenciadas por 24 h na ausência de soro fetal bovino, e tratadas com cerulenina ou orlistat conforme condições estabelecidas. Terminados os tratamentos, as células foram lavadas, tripsinizadas, fixadas em etanol 70% gelado e mantidas a -20°C até a marcação com iodeto de propídeo. A **Fig. 8** mostra que somente o tratamento com cerulenina, mas não com orlistat, reduz significativamente a proliferação das células melan-a, demonstrada pela diminuição da porcentagem de células na fase S e aumento das células em G0/G1.

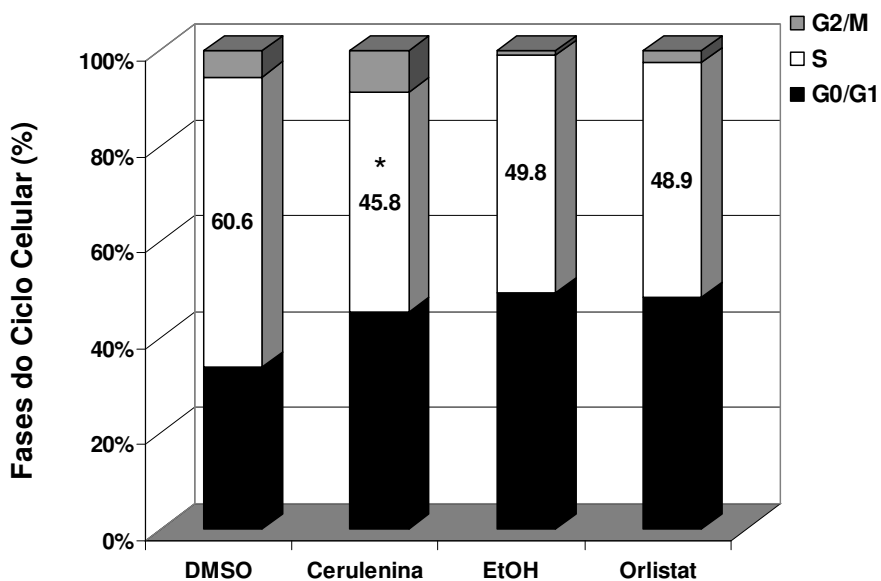


Fig. 8: O tratamento com cerulenina, mas não com orlistat, reduz a proliferação das células melan-a.

As células melan-a foram plaqueadas, carenciadas com meio de cultivo na ausência de SFB, por 24 h e, em seguida, tratadas com $5 \mu\text{g/mL}$ de cerulenina por 24 h ou com $30 \mu\text{M}$ de orlistat por 48 h, na presença de 5% de SFB. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada em citometria de fluxo após marcação com $50 \mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo. Os valores representam a média \pm EPM de 8 experimentos distintos; $*p < 0,05$, tratamento *versus* controle, teste *t* de Student.

Nossos dados iniciais mostram que ambos os tratamentos com os inibidores de FASN, cerulenina e orlistat, resultaram em inibição da proliferação e morte celular por apoptose em células melan-a.

A apoptose é uma importante via de indução de morte celular que pode ser ativada em resposta a vários sinais intra e extracelulares, onde a mitocôndria pode ter participação direta ou indireta na ativação dessa morte, através da emissão de inúmeros sinais pró-apoptóticos, dos quais são estimulados por diversos fatores, dentre eles, pelo aumento da produção de EROs, que por sua vez, caracteriza a condição de estresse oxidativo que pode preceder a morte celular (Zamzami et al. 1996; Brenneisen et al. 1998; Kowaltowski e Vercesi 1999), através de peroxidação de lipídios de membrana e da abertura de poros em ambas as membranas mitocondriais, interna e externa (Ouyang e Giffard 2004).

Desse modo, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada em períodos iniciais do tratamento com cerulenina e orlistat, visto que estresse oxidativo pode preceder a apoptose em células tumorais (Zecchin et al. 2007). As células melan-a foram plaqueadas ($4,75 \times 10^4$ /mL) e tratadas com 5 μ g/mL de cerulenina ou com 30 μ M de orlistat por 6 h. Terminados os tratamentos, as células foram lavadas, tripsinizadas, marcadas com 3 μ M de H₂DCF-DA a 37°C por 45 min, para determinação dos níveis de EROs citosólicas (LeBel et al. 1992) e lidas em citômetro de fluxo, em canal FL-1. Para quantificação das EROs mitocondriais, as células foram marcadas com 3 μ M de MitoSox a 37°C por 10 min e lidas em canal FL-2 (Payne et al. 2007). A **Fig. 9** mostra que a morte celular induzida por ambos inibidores de FASN, cerulenina e orlistat, não é precedida pelo aumento de EROs, ou seja, tal apoptose não é precedida por estresse oxidativo.

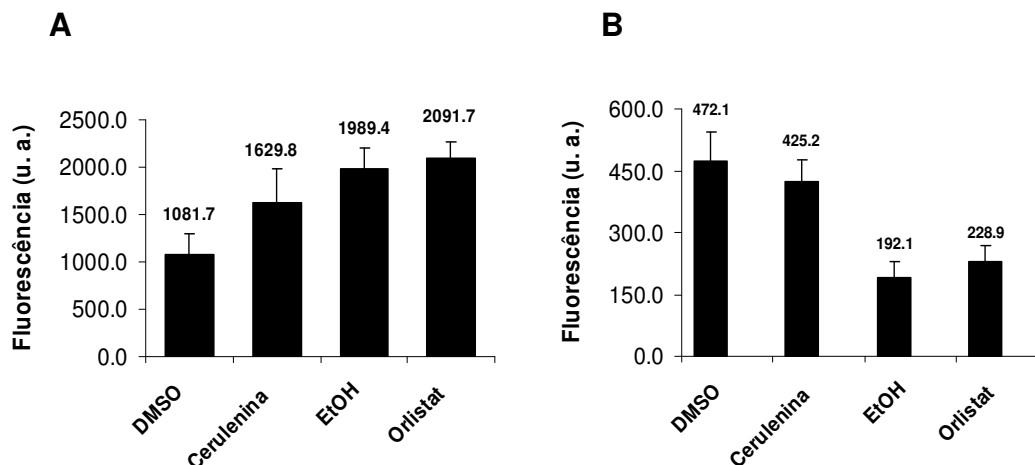


Fig. 9: A apoptose induzida por orlistat e cerulenina nas células melan-a não é precedida por aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). Produção de EROs citosólicas (A) e mitocondriais (B) das células melan-a após tratamento com 5 µg/mL de cerulenina ou com 30 µM de orlistat por 6 h. A produção de EROs foi determinada em citometria de fluxo após marcação com 3 µM de H₂DCF-DA (A) ou com 5 µM de MitoSox (B). Os valores representam a média ± EPM de 6 experimentos distintos.

Vários são os processos que desencadeiam a morte celular por apoptose e, para verificar o envolvimento mitocondrial na morte induzida pela inibição de FASN, analisamos se houve ou não liberação de citocromo c, conforme descrito previamente (Campos et al. 2004), já que é uma proteína essencial para a ativação das caspases, na via intrínseca da apoptose (Takahashi et al. 2004, Polster e Fiskum, 2004). A **Fig. 10** mostra que a liberação de citocromo c foi discreta após o tratamento com ambos os inibidores de FASN.

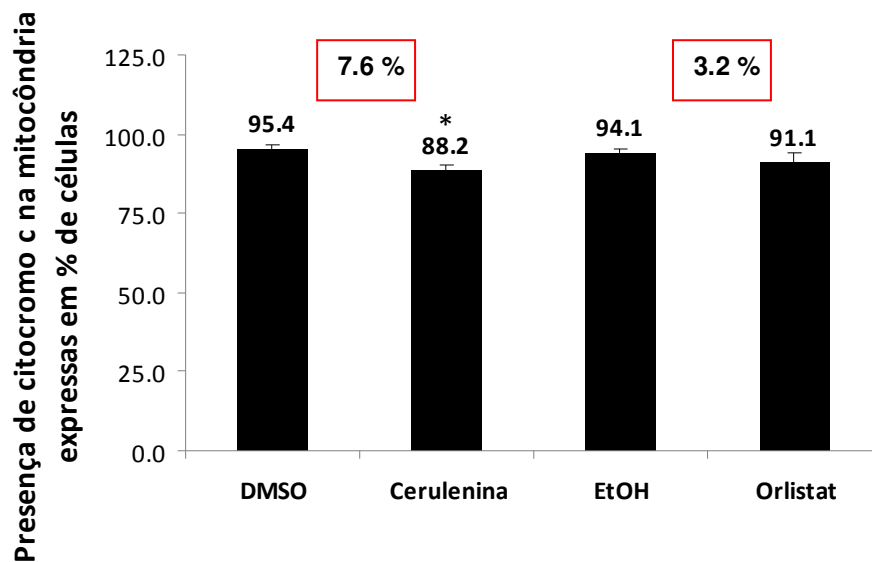


Fig. 10: O tratamento com inibidores de FASN induz discreta liberação de citocromo c. Análise da porcentagem de citocromo c em mitocôndrias de melan-a após tratamento com 5 µg/mL de cerulenina por 24 h ou com 30 µM de orlistat por 48 h, em citometria de fluxo após incubação com anticorpo contra citocromo c (1:500). Os valores representam a média ± EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, tratamento *versus* controle, teste *t* de Student.

Apesar da discreta liberação de citocromo c mostrada na **Fig. 10**, verificamos que o tratamento das células melan-a com cerulenina ou orlistat, resultou em significativa ativação de caspase-3, principalmente após o tratamento com cerulenina (**Fig 11**).

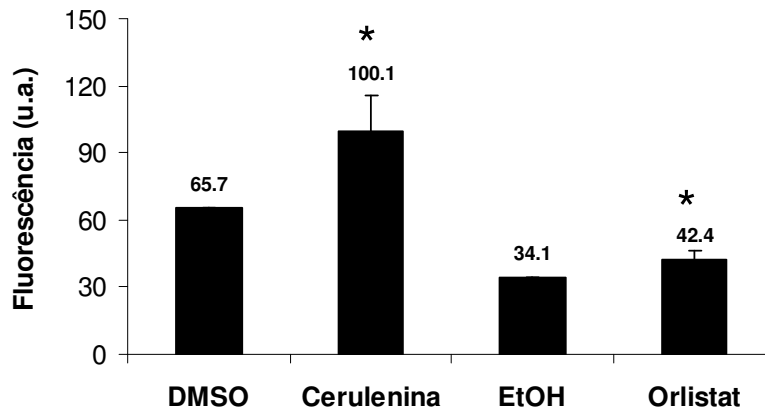


Fig. 11: A morte induzida pela inibição de FASN é acompanhada por ativação de caspase-3. Ativação de caspase-3 nas células melan-a após tratamento com 5 µg/mL de cerulenina por 24 h ou com 30 µM de orlistat por 48 h, em citometria de fluxo após marcação com FITC-DEVD-FMK (1:300). Os valores representam a média ± EPM de 6 experimentos distintos; * $p < 0,05$, tratamento *versus* controle, teste *t* de Student.

Uma das vias que desencadeia a apoptose é originária de lesão de DNA e envolve a proteína supressora de tumor p53. Esta tem papel importante no controle da regulação da expressão gênica relacionadas à parada do ciclo celular, uma vez que interrompe o ciclo celular na fase G₁, promovendo reparo do material genético ou desencadeando a apoptose, quando o DNA é lesado (Walworth 2000; McGowan 2003; Ishikawa et al. 2004, Jiang et al., 2006). Além disso, a ativação de p53 mostrou-se associada à apoptose induzida pela inibição de FASN em células de câncer de mama, cólon e neuroblastoma (Li et al. 2001; Heiligtag et al. 2002). No entanto, no presente modelo utilizando as células não tumorigênicas melan-a, a apoptose mostrou-se independente de ativação de p53, visto que o tratamento prévio das células com *pifithrin-alpha* (PFT), conhecido inibidor sintético de p53 (Komarov et al. 1999), não protegeu contra a morte (**Fig. 12**).

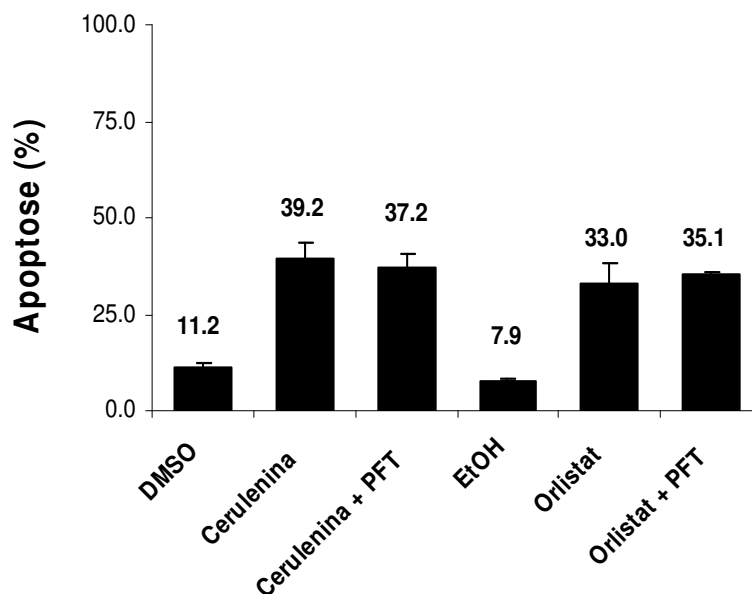


Fig. 12: A apoptose induzida pela inibição de FASN em células melan-a é independente da ativação de p53. As células melan-a foram plaqueadas e, após 24 h, foram pré-incubadas por 30 min com 10 μ M do inibidor de p53, PFT, (*pifithrin-alpha*) e tratadas com 5 μ g/mL de cerulenina por 24 h ou com 30 μ M de orlistat por 48 h. Os índices de apoptose foram determinados em citometria de fluxo após marcação com anexina V-FITC (1:500) Os valores representam a média \pm EPM de 5 experimentos distintos. Adicionalmente foram testadas outras concentrações de PFT (5 e 20 μ M), as quais também não apresentaram efeitos sobre a morte celular.

Conforme demonstrado anteriormente, o tratamento com inibidores de FASN resultou em apoptose das células não-tumorigências melan-a, diferentemente do que já foi previamente demonstrado na literatura, onde não são relatados efeitos citotóxicos decorrentes do uso dos inibidores de FASN, tanto para tecidos normais como medula óssea, pele, fígado e trato gastrointestinal como para células normais derivadas de fibroblastos de pele humana (JW, *Non Transformed Human Skin Fibroblasts*), fibroblastos derivados de cultura primária de gengiva de indivíduos normais, fibroblastos (NHLF, *Normal Human Lung Fibroblasts*) e queratinócitos humanos (NHEK, *Normal Human Epidermal Keratinocytes*) (Pizer et al. 2000 a, b, Pizer et al. 1996, Helligtag, et al. 2002, Zhang et al. 2005). Desse modo, para investigar se esses efeitos são de fato decorrentes da inibição da FASN ou se são resultado de um efeito citotóxico das drogas, prosseguiu-se com o

silenciamento da FASN, conforme descrito previamente para as células de melanoma murino B16-F10 (Carvalho et al. 2008). A **Fig. 13** mostra que a ausência de expressão de FASN após seu silenciamento não foi suficiente para induzir apoptose da mesma maneira que foi observado para cerulenina e orlistat (**Figs. 6E e 7E**). Tais resultados sugerem que (1) a morte induzida por cerulenina ou orlistat possa ser resultado de um efeito citotóxico das drogas ou (2) que as células melan-a possam ser menos dependentes de FASN do que as tumorais e talvez o silenciamento gênico não seja suficiente para induzir a morte.

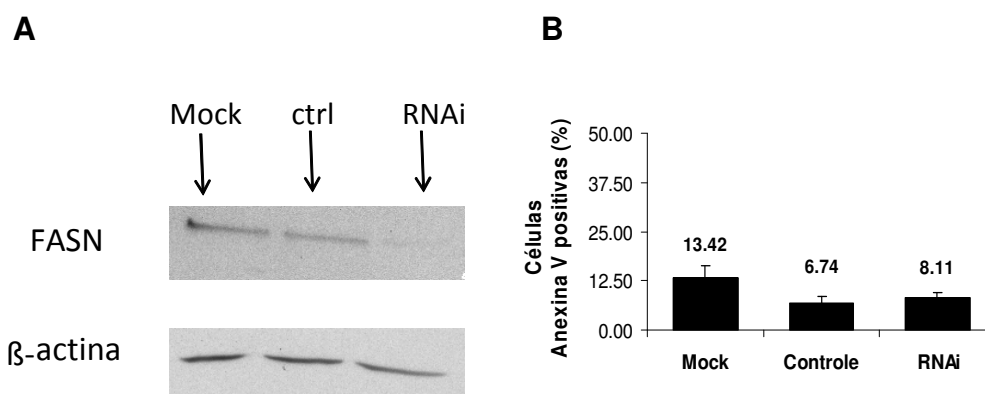


Fig. 13: O silenciamento de FASN não induz morte celular em melanoblastos não tumorigênicos, melan-a. As células melan-a foram plaqueadas, em meio de cultura, sem a presença de antibióticos. Após 24 h, as células foram transfectadas com 200 nM de anti-FASN *small interfering RNA* (siRNA) Oligo 1, Oligo 2 e Oligo 3 ou 200 nM do Oligo controle (Invitrogen *Stealth™ RNAi Negative Control Duplexes*); com 2 μ g/mL Lipofectamina 2000 (Invitrogen). As soluções contendo as seqüências de siRNA e Lipofectamina foram preparadas em OptiMEM (Gibco (Invitrogen)). Após 4 h de transfecção, foram adicionados 500 μ L de meio OptiMEM suplementado com 3% de SFB e 200 nM de TPA, para que a concentração final de SFB ficasse a 1%. Após 48 h da transfecção, as células foram coletadas para a verificação da inibição da expressão de FASN através de western blotting (**A**) e determinação das taxas de apoptose (**B**). Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, tratamento *versus* controle, teste *t* de Student.

Com o objetivo de avaliar possíveis mudanças no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após tratamento com cerulenina e orlistat, cerca de 2×10^6 células/mL das melan-a foram permeabilizadas com 15 μ M de digitonina em 2 mL de meio de reação (ver metodologia) na presença de safranina O, e as alterações de fluorescência foram monitoradas. Uma vez permeabilizada, a membrana plasmática facilita a entrada da

safranina O, resultando em sua adsorção pelas membranas das mitocôndrias energizadas, com conseqüente diminuição da emissão da fluorescência (Holden e Sze 1989). A molécula CCCP, protonóforo que leva à eliminação de $\Delta\Psi_m$, causa liberação da safranina O das mitocôndrias possibilitando estimar as diferenças do $\Delta\Psi_m$. A **Fig. 14** mostra que os tratamentos com cerulenina e orlistat resultaram em diminuição significativa do $\Delta\Psi_m$ em células melan-a.

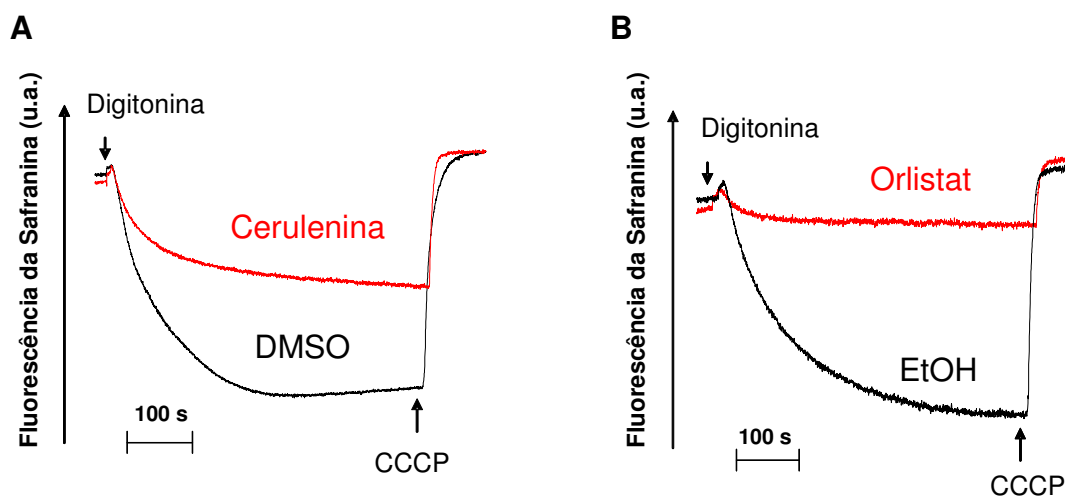


Fig. 14: O tratamento com inibidores de FASN diminui o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células melan-a. Mudanças no $\Delta\Psi_m$ de células melan-a permeabilizadas com digitonina foram estimadas através da fluorescência do marcador safranina O (Holden e Sze 1989) em espectrofotômetro Hitachi, modelo F-4500, com 495/586 nm de comprimento de onda de excitação/emissão, com slit na largura de 5,0 nm. Melan-a após tratamento com 5 $\mu\text{g/mL}$ de cerulenina por 24 h (A) ou com 30 μM de orlistat por 48 h (B). Cerca de 2×10^6 células/mL foram permeabilizadas com 15 μM de digitonina em 2 mL meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10mM de HEPES, 1 mM de Mg, 65 mM de Tris-HCl (pH 7,2), 2,5 mM de Na_2HPO_4 , 50 μM de EGTA, 5 mM de succinato, 0,01 % de BSA, 5 mM de safranina O e 1 μM de CCCP, mantidos sob agitação constante a 37°C. Resultados representativos de 3 experimentos distintos.

Considerando tais mudanças no $\Delta\Psi_m$ após o tratamento das células melan-a com os inibidores de FASN, analisamos a capacidade de respiração das mitocôndrias das células melan-a, após tratamento com cerulenina ou orlistat (**Fig. 15**). Observamos que a cerulenina causou inibição de 56,4% na velocidade de respiração no estado de repouso,

enquanto o orlistat inibiu 50%. Assim sendo, o efeito dos inibidores de FASN sobre o potencial de membrana mitocondrial e sobre a respiração de células melan-a explica o envolvimento mitocondrial na morte induzida por cerulenina ou orlistat.

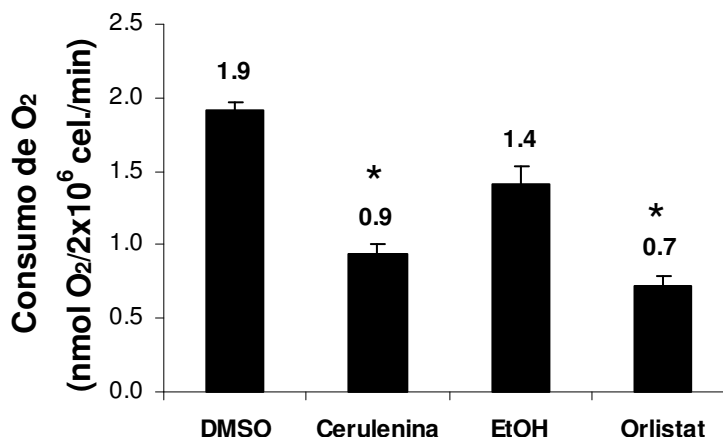


Fig. 15: Inibição da respiração das células melan-a por cerulenina ou orlistat: O consumo de oxigênio pelas células melan-a após tratamento por 24 h com cerulenina (5 µg/mL) ou com orlistat por 48 h (30 µM) foi medido utilizando-se um eletrodo tipo Clark. Após os tratamentos as células foram lavadas, tripsinizadas e cerca de 2×10^6 células/mL foram adicionadas em 2 mL de meio de reação, contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 65 mM de Tris-HCl (pH 7,2), 2,5 mM de Na_2HPO_4 , 50 µM de EGTA, 0,01 % de BSA e substratos de complexo I: 2,0 mM de malato, 1,0 mM de α -cetoglutarato, 1,0 mM de piruvato e 1,0 mM de glutamato, em uma câmara de acrílico fechada equipada com agitador magnético. A temperatura foi mantida a 37°C. Os valores representam a média \pm EPM de 4 experimentos distintos;

* $p < 0,05$, tratamento *versus* controle, teste *t* de Student.

A fim de verificar se tais efeitos dos inibidores de FASN são específicos ou não para as células melan-a, analisamos seus efeitos em outra linhagem celular não tumorigênica derivada de queratinócitos humanos (HaCaT, da Cell Line Service, Heidelberg, Alemanha). Primeiro comparamos o conteúdo protéico de FASN entre as duas linhagens em questão e a **Fig. 16** mostra que o conteúdo de FASN nas melan-a é 2,3 vezes maior que nas HaCaT.

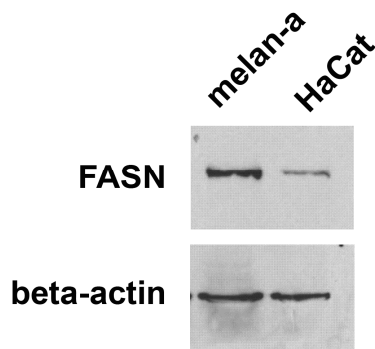


Fig. 16: As células melan-a apresentam 2,3 vezes mais FASN do que as células HaCaT. Western blotting realizado a partir de extratos de células melan-a e HaCaT. Quantidades iguais de proteína total (40 µg) foram separadas eletroforéticamente e as membranas incubadas com anticorpos contra FASN (1:3,000) ou beta-actina (1:50,000). Observa-se que as células melan-a apresentam quantidades significativamente superiores da proteína FASN, em relação às células HaCaT (0,678 *versus* 0,294 u.a., melan-a *versus* HaCaT, dados normalizados pela beta-actina).

Assim como feito para as células melan-a, avaliamos os efeitos de doses crescentes dos inibidores de FASN sobre a proliferação, viabilidade e morte celular das HaCaT. Inibição significativa da proliferação das células HaCaT é observada (**Fig. 17**) já com o tratamento de 5,0 µg/mL de cerulenina por 24 h, demonstrado pela redução do número de células totais. A morte celular foi o resultado do tratamento com cerulenina, vista tanto pela redução de células viáveis, quanto pelo aumento da porcentagem de células inviáveis (**Fig. 17 B-D**). A **Fig. 17 E** mostra que a cerulenina induz morte celular por apoptose nas células HaCaT, já que os índices de necrose após a marcação com 7-AAD, mostraram valores inferiores a 5% (dados não mostrados).

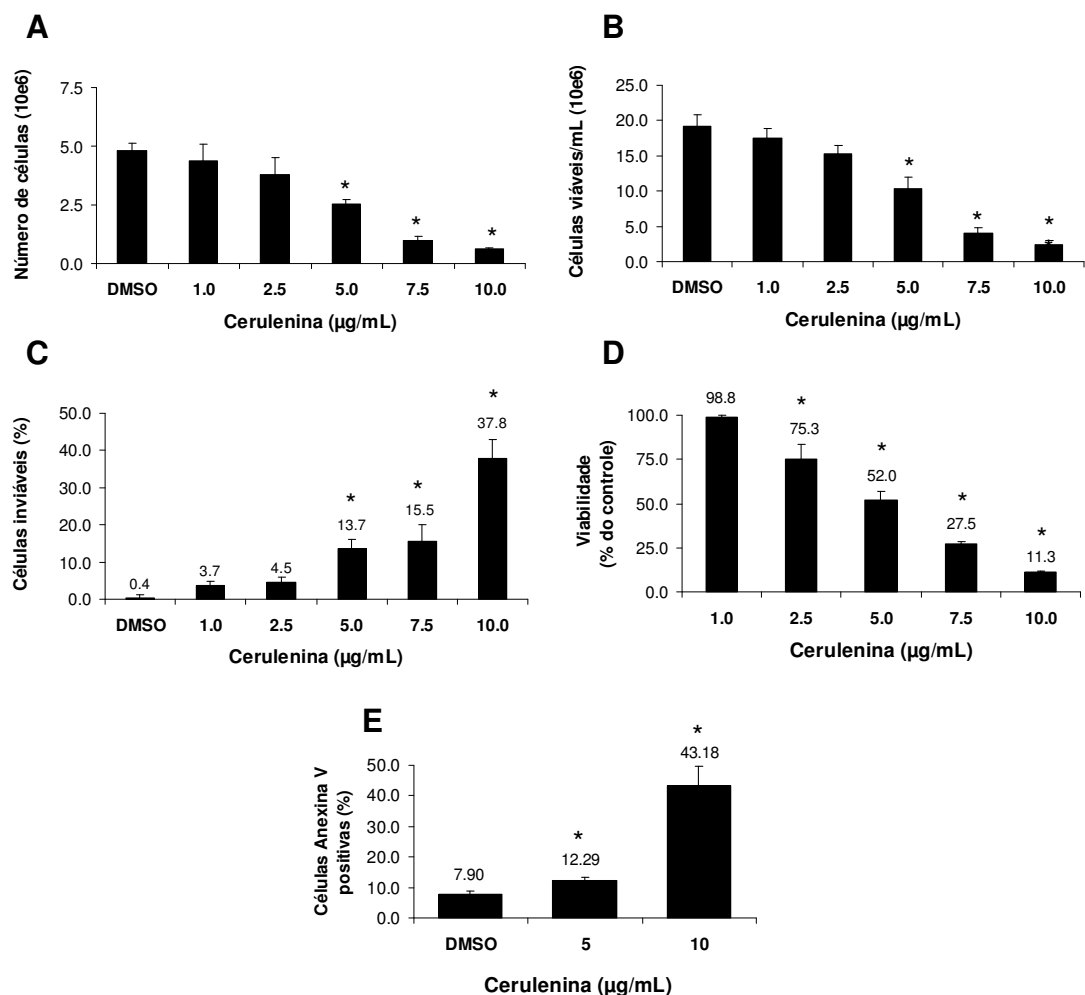


Fig. 17: A inibição de FASN com cerulenina reduz a viabilidade das células HaCaT. As células HaCaT foram tratadas com doses crescentes de cerulenina por 24 h. Após o tratamento, o número de células totais (A), viáveis (B) e inviáveis (C) foi estimado pelo método do azul de tripan. As células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 100 µL de meio de cultura contendo 10% de SFB. Cerca de 20 µL de células foram corados em 20 µL de azul de tripan 0,1% e contadas as células presentes em 4 quadrantes de um hemocítmetro. Foram contabilizados o número total de células, o número de células viáveis (não coradas) e o número de células inviáveis (coradas em azul). A viabilidade celular também foi determinada por ensaio de MTT (D) e os índices de apoptose foram determinados após marcação com anexina V-FITC (1:500) (E). Os valores representam a média ± EPM de no mínimo 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, cerulenina versus DMSO, teste *t* de Student.

Em seguida, foram avaliados os efeitos do tratamento com orlistat sobre a viabilidade e proliferação das células HaCaT. A **Fig. 18** mostra que 10 μ M de orlistat por 48 h inibe significativamente a proliferação das HaCaT, conforme observado pela redução do número de células totais (**Fig. 18 A**). Assim como observado para cerulenina, a inibição de FASN com orlistat também resultou em redução de células viáveis, aumento da porcentagem de células inviáveis (**Fig. 18 B-D**) e em morte celular induzida por apoptose (**Fig. 18 E**). Desse modo, nossos dados demonstram inibição da proliferação celular e indução de morte celular em linhagem celular não tumorigênica HaCaT após tratamento com inibidores de FASN, mostrando também uma maior resistência das células contra os efeitos dos inibidores de FASN comparadas com a melan-a. Assim como verificado para o tratamento com cerulenina, a administração de orlistat também não induziu níveis significativos de necrose (dados não mostrados).

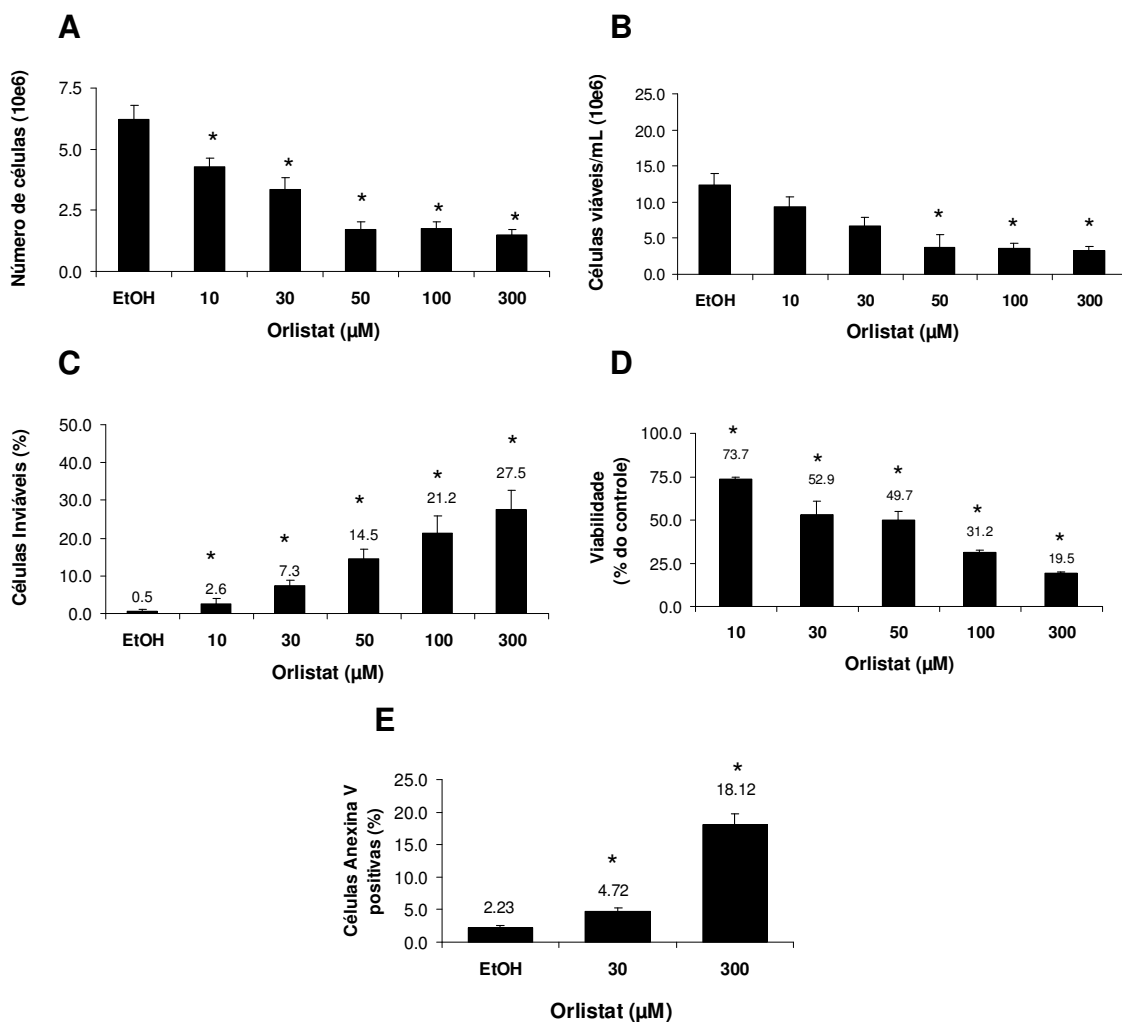


Fig. 18: A inibição de FASN com orlistat reduz a viabilidade das células HaCaT. As células HaCaT foram tratadas com doses crescentes de orlistat por 48 h. Após o tratamento, o número de células totais (A), viáveis (B) e inviáveis (C) foi estimado pelo método do azul de tripan, as células foram lavadas em PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 100 µL de meio de cultura contendo 10% de SFB. Cerca de 20 µL de células foram corados em 20 µL de azul de tripan 0,1% e contadas as células presentes em 4 quadrantes de um hemocítometro. Foram contabilizados o número total de células, o número de células viáveis (não coradas) e o número de células inviáveis (coradas em azul). A viabilidade celular também foi determinada por ensaio de MTT (D) e os índices de apoptose foram determinados após marcação com anexina V-FITC (1:500) (E). Os valores representam a média ± EPM de 6 experimentos distintos; * $p < 0,05$, orlistat *versus* EtOH, teste *t* de Student.

Por último, do mesmo modo como foi encontrado nas células melan-a, a redução do número total de células HaCaT após o tratamento com ambos os inibidores de FASN (**Fig. 17A e 18A**) sugere redução na proliferação celular. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi então avaliada, e a **Fig. 19** interessantemente mostra que o tratamento com ambas as drogas reduz, de maneira significativa, a proliferação das células HaCaT, verificada pela diminuição da porcentagem de células na fase S e aumento das células em G0/G1.

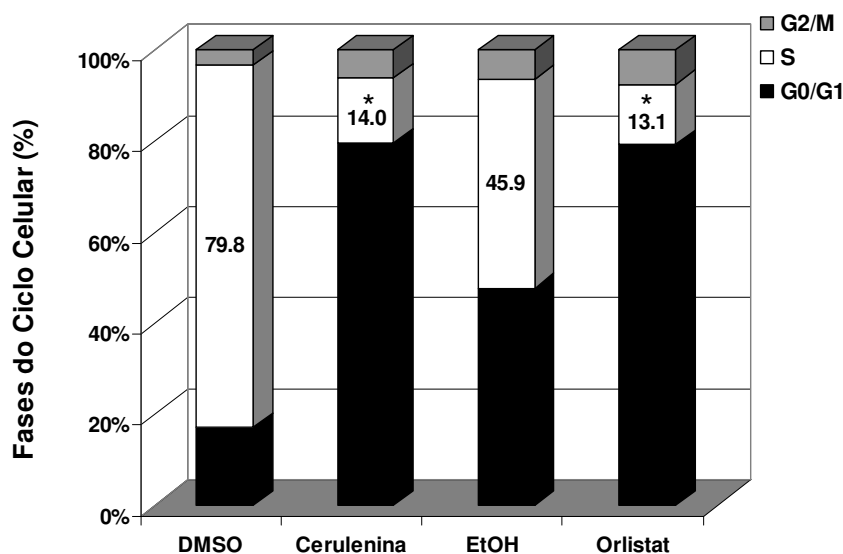


Figura. 19: A inibição de FASN com cerulenina ou orlistat reduz a proliferação das células HaCaT. As células HaCaT foram plaqueadas, carenciadas com meio de cultivo, na ausência de SFB por 24 h e tratadas com 10 µg/mL de cerulenina por 24 h ou com 300 µM de orlistat por 48 h. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada em citometria de fluxo após marcação com 50 µg/mL de iodeto de propídeo. Os valores representam a média ± EPM de 6 experimentos distintos; * $p < 0,05$, tratamento *versus* controle, teste *t* de Student.

DISCUSSÃO

A atribuição da FASN como possível alvo quimioterápico vem sendo descrita ultimamente na literatura pelo fato de sua expressão ser baixa ou até mesmo ausente na maioria dos tecidos normais e muito aumentada em diversas neoplasias malignas. (Milgraum et al. 1997, Alo et al. 2000, Swinnen et al. 2002, Pizer et al. 1998, Vlad et al. 1999, Piyathilake et al. 2000, Visca et al. 1999, Nemoto et al. 2001, Kusakabe et al. 2002, Innocenzi et al. 2003, Visca et al. 2003, Krontiras et al. 1999, Agostini et al. 2004, Silva et al. 2004, Takahiro et al. 2003; Rossi et al., 2006). Vários estudos relacionam a atividade aumentada desta enzima com a agressividade de algumas neoplasias (Epstein et al. 1995, Alo et al. 1996, Gansler et al. 1997, Kuhajda, 2000). Além disso, inibidores específicos da atividade de FASN são responsáveis pelo bloqueio do ciclo celular com redução significativa da proliferação e aumento das taxas de apoptose em células neoplásicas de próstata, mama, estômago, intestino, endométrio, cavidade bucal e ovário (Furuya et al., 1997; Pizer et al., 1998; Li et al., 2001; Agostini et al., 2004; Menendez et al., 2005; Menendez et al., 2006). Tem sido também descrito que os inibidores de FASN tem efeito anti-tumoral significativo sem apresentar toxicidade para a proliferação de tecidos normais como medula óssea, pele, fígado e trato gastrointestinal (Pizer et al. 2000a,b). Em contraste com estes dados, trabalho recente da literatura mostrou que a inibição de FASN por cerulenina reduz a proliferação de fibroblastos normais em culturas primárias (Almeida et al. 2005).

No presente trabalho realizamos estudos com inibidores da FASN (cerulenina e orlistat) em células melan-a, derivadas de melanoblastos não tumorigênicos de camundongos (Bennett et al. 1987). Para melhor compreender os efeitos causados pelos inibidores de FASN em células não tumorigênicas melan-a, alguns experimentos foram também realizados com outro tipo de células não tumorais derivadas de queratinócitos humanos normais (HaCaT), as quais crescem no mesmo microambiente onde se origina o melanoma cutâneo. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento de células melan-a e HaCaT com cerulenina, por 24 h, resultou em expressiva porcentagem de células em apoptose, inibição da proliferação celular e acúmulo de células em G0/G1 (**Figs. 6, 8, 17 e 19**). Tais dados corroboram com os achados de Almeida et al. (2005) mostrando que a inibição de FASN por cerulenina reduziu a proliferação de fibroblastos normais em culturas primárias, mesmo sendo a cerulenina descrita como agente citotóxico seletivo para células

cancerígenas (Kuhajda et al. 1994, Pizer et al. 1996a, Pizer et al. 1996b, Furuya et al. 1997, Pizer et al. 1998, Kuhajda 2000, Chen et al. 2000, Zhao et al. 2006). Outros resultados relatam que fibroblastos (NHLF) e queratinóticos (NHEK) não tumorais mostraram-se resistentes aos efeitos apoptóticos da cerulenina, mesmo após tratamento com 15 µg/mL da droga (Helligtag et al. 2002).

Quanto ao orlistat, nossos resultados mostram que este composto induz morte de melan-a e HaCaT, após 48 h de tratamento (**Figs. 7 e 18**). O orlistat reduziu significativamente a proliferação das células HaCaT (**Fig. 19**), mas não alterou a distribuição das melan-a nas fases do ciclo celular (**Fig. 8**). Desse modo, parece-nos que o orlistat apenas induz apoptose nas células melan-a, sem alterar a proliferação das mesmas, sendo provável que a redução do número de células totais, observada na **Fig. 7**, seja apenas decorrente da morte. Tais achados concordam com o trabalho de Browne et al. (2006), onde células endoteliais normais HUVEC tratadas com orlistat apresentaram redução da proliferação e apoptose, após 24 e 48 h de tratamento, respectivamente. Por outro lado, foi previamente demonstrado que células normais derivadas de epitélio bovino não apresentaram nenhum efeito após tratamento com altas concentrações de orlistat (100 a 500 µM) (Dowling et al. 2009).

Sabe-se que, quanto maior o conteúdo de FASN, maior a sensibilidade das células aos seus inibidores, ou seja, maiores os efeitos anti-proliferativos e as taxas de apoptose (Pizer et al. 1996a, 1996b, 1998, Furuya et al. 1997, Kuhajada et al. 2000, Li et al. 2001, Knowles et al. 2004, Kridel et al. 2004, Menendez et al. 2004, 2005a). De acordo com isso, as células melan-a, que possuem cerca de 2,3 vezes mais FASN do que as HaCaT (**Fig. 15**), mostraram índices de apoptose superiores as HaCaT (compare **Figs. 6 e 7** com **17 e 18**). Em contraste, as HaCaT foram bem mais sensíveis aos efeitos anti-proliferativos de cerulenina e orlistat do que as melan-a (compare **Figs. 8** com **19**). Em conjunto estes resultados permitem levantar a hipótese de que os efeitos de cerulenina e orlistat nestas células sejam FASN-independentes.

Conforme descrito anteriormente, a inibição de FASN induz diversas alterações que culminam na apoptose de células tumorais (*rever item 1.1.3*), mas seus mecanismos não estão completamente elucidados. Menos ainda sabe-se sobre os efeitos de tais agentes sobre

células “normais” e poucos são os trabalhos que trazem algum tipo de informação sobre tais células (Almeida et al. 2005, Browne et al. 2006, Silva et al. 2008). Assim, analisamos no presente trabalho se a apoptose observada nas células melan-a seria mediada pela proteína supressora de tumor p53, uma vez que a expressão de mutantes dominante-negativos para p53 aumentou a susceptibilidade de células de câncer de colon aos inibidores de FASN (Li et al. 2001). Entretanto, os resultados mostraram que a apoptose foi independente de ativação de p53, visto que o tratamento prévio das células com *pifithrin-alpha* (PFT), conhecido inibidor sintético de p53 (Komarov et al. 1999), não protegeu contra a morte (**Fig. 12**). Estes resultados estão de acordo com achados de Heiligttag et al. (2002) e Zhao et al. (2006), indicando que a apoptose em diversas linhagens de células tumorais causada por inibidores de FASN foram independentes de p53.

Outro mecanismo descrito sobre a apoptose decorrente da inibição de FASN é a ativação da via *extrínseca* da apoptose, após o acúmulo de ceramida (Bandyopadhyay et al. 2006). Para checar qual a via envolvida no caso das células melan-a, optamos por analisar a possível participação da via *intrínseca* da apoptose, através da liberação de citocromo c e ativação de caspase-3. As **Figs. 10 e 11** mostram que o tratamento das melan-a com cerulenina ou orlistat induziu discreta liberação de citocromo c e baixa ativação de caspase-3, quando comparadas com a ação dos inibidores de FASN em células tumorais (Heiligttag et al. 2002, Liu et al. 2006). A ativação de caspase-3 também pode ocorrer por mecanismo independente da liberação de citocromo c, ou seja independente da via *intrínseca* (Budihardjo et al. 1999, Porter et al. 1999, Elmore 2007), portanto a via *extrínseca* ainda precisa ser checada, ou seja, o seu envolvimento não pode ser descartado nestes processos de morte celular testados.

Em células “normais” os efeitos de citotoxicidade e morte celular dos inibidores de FASN não são creditados à inibição desta enzima (Heiligttag et al. 2002, Knowles et al. 2004, Kridel et al. 2004, Menendez et al. 2004, 2005c), uma vez que as células normais não dependem da atividade da FASN como fonte de ácidos graxos (Kuhajda et al. 2000, Chirala et al. 2001). Como então justificar a morte das células melan-a após tratamento com inibidores de FASN? Na tentativa de obter uma resposta a este questionamento, optamos por silenciar esta enzima e ver como as células melan-a se comportavam em relação à

morte. De fato, o silenciamento de FASN não induziu morte (**Fig. 13**), confirmando que as melan-a não dependem da síntese endógena de ácidos graxos. Isto sugere que os efeitos citotóxicos de cerulenina e orlistat sobre estas linhagens celulares sejam realmente independentes da inibição de FASN.

Com base em dados da literatura (Heiligtag et al. 2002, Liu et al. 2006, Chajes et al. 2006, Migita et al. 2009, Samudio et al. 2010) e nas características descritas anteriormente, o passo seguinte foi analisar o possível envolvimento mitocondrial na morte das células melan-a induzida por orlistat e cerulenina.

Até cerca de quatro décadas, a mitocôndria era conhecida como a usina de energia da célula, uma vez que acreditava-se que suas funções principais consistiam na fosforilação oxidativa (geração de ATP utilizando energia proveniente do processo de respiração). Este processo é vital para todos os organismos aeróbicos, uma vez que a deficiência de ATP leva a morte celular (Kowaltowski et al. 2009).

A demonstração de que a respiração promove uma diferença na concentração de prótons (um gradiente de prótons) entre o interior da mitocôndria e o espaço que separa suas membranas interna e externa gerando um potencial elétrico-químico que a célula usa como fonte de energia para fosforilar a adenosina-difosfato (ADP), sintetizando ATP, revelou a importância da impermeabilidade da membrana interna para a saúde da mitocôndria e sobrevivência da célula. Constatou-se, em seguida, que a perda dessa impermeabilidade constitui, em muitas condições patológicas, um evento-chave no processo de morte celular programada ou acidental, o que fez da mitocôndria um centro de atenções em estudos de fisiopatologia e de ações de agentes citotóxicos. Além disso, as reações de oxidação-redução envolvidas no transporte de elétrons, durante a respiração celular, geram como subproduto, espécies reativas de oxigênio, tóxicas a praticamente todos os componentes das células e das próprias mitocôndrias, quando a capacidade antioxidante da célula é deficiente ou quando algum agente tóxico estimula a produção de oxigênio reativo.

Vimos que o tratamento com cerulenina ou orlistat resultou em perda do potencial elétrico de membrana (**Fig. 14**), efeito que impede a produção mitocondrial de ATP. Uma

vez verificada a perda do $\Delta\Psi_m$ após o tratamento com cerulenina ou orlistat, buscamos a explicação do seu mecanismo. Assim, verificamos que na faixa de doses usadas nos experimentos anteriores, ambas as drogas inibem em cerca de 50% a respiração mitocondrial no estado de repouso. Interessante notar que, apesar da inibição da respiração e da fosforilação oxidativa, o tratamento com cerulenina ou orlistat não levou a aumento da produção de EROs (**Fig. 9**) e culminou em redução da síntese de ATP, resultando em apoptose. Portanto, nesse caso provavelmente o ATP é proveniente de glicólise.

Em conjunto, nossos dados sugerem que a morte celular induzida por cerulenina ou orlistat, em células melan-a, não seja dependente da inibição da enzima ácido graxo sintase, mas sim consequência de inibição da respiração mitocondrial.

CONCLUSÕES

1. Inibidores de FASN induzem morte celular por **apoptose** em melanócitos não tumorigênicos, melan-a.
2. O efeito dos inibidores de FASN sobre o potencial de membrana mitocondrial e sobre a respiração de células melan-a explica o envolvimento mitocondrial na morte induzida por cerulenina ou orlistat.
3. Queratinócitos HaCaT são mais resistentes à apoptose induzida por inibidores de FASN, mas mais sensíveis aos seus efeitos antiproliferativos, quando comparados com as células melan-a.
4. Tudo indica que a morte celular induzida por cerulenina e orlistat nas células HaCaT seja independente de FASN, assim como as melan-a.

Referências Bibliográficas

Agostini, M., S. D. Silva, *et al.* Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. Oral Oncol, v.40, n.7, Aug, p.728-35. 2004.

Alirol, E. e J. C. Martinou. Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? Oncogene, v.25, n.34, Aug 7, p.4706-16. 2006.

Almeida, J. P., R. D. Coletta, *et al.* Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. J Periodontol, v.76, n.2, Feb, p.272-8. 2005.

Alo, P. L., P. Visca, *et al.* Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. Oncol Rep, v.7, n.6, Nov-Dec, p.1383-8. 2000.

Bandyopadhyay, S., R. Zhan, *et al.* Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. Cancer Res, v.66, n.11, Jun 1, p.5934-40. 2006.

Baron, A., T. Migita, *et al.* Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? J Cell Biochem, v.91, n.1, Jan 1, p.47-53. 2004.

Basso, E., L. Fante, *et al.* Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. J Biol Chem, v.280, n.19, May 13, p.18558-61. 2005.

Bennett, D. C., P. J. Cooper, *et al.* A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. Int J Cancer, v.39, n.3, Mar 15, p.414-8. 1987.

Beutner, G., A. Ruck, *et al.* Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. Biochim Biophys Acta, v.1368, n.1, Jan 5, p.7-18. 1998.

Bligh, E. G. e W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol, v.37, n.8, Aug, p.911-7. 1959.

Boveris, A. e B. Chance. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J, v.134, n.3, Jul, p.707-16. 1973.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Brdiczka, D., G. Beutner, *et al.* The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. Biofactors, v.8, n.3-4, p.235-42. 1998.

Brenneisen, P., J. Wenk, *et al.* Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-

degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. J Biol Chem, v.273, n.9, Feb 27, p.5279-87. 1998.

Briggs, M. R., C. Yokoyama, *et al.* Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. J Biol Chem, v.268, n.19, Jul 5, p.14490-6. 1993.

Brink, J., S. J. Ludtke, *et al.* Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.1, Jan 8, p.138-43. 2002.

Brown, M. S. e J. L. Goldstein. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell, v.89, n.3, May 2, p.331-40. 1997.

Brown, M. S. e J. L. Goldstein. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.20, Sep 28, p.11041-8. 1999.

Browne, C. D., E. J. Hindmarsh, *et al.* Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. Faseb J, v.20, n.12, Oct, p.2027-35. 2006.

Budihardjo, I., H. Oliver, *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol, v.15, p.269-90. 1999.

Campos, C. B., G. R. Degasperi, *et al.* Ibuprofen-induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome c release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition. Biochem Pharmacol, v.68, n.11, Dec 1, p.2197-206. 2004.

Campos, C. B., B. A. Paim, *et al.* Method for monitoring of mitochondrial cytochrome c release during cell death: Immunodetection of cytochrome c by flow cytometry after selective permeabilization of the plasma membrane. Cytometry A, v.69, n.6, Jun, p.515-23. 2006.

Carvalho, M. A., K. G. Zecchin, *et al.* Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. Int J Cancer, v.123, n.11, Dec 1, p.2557-65. 2008.

Castilho, R. F., A. J. Kowaltowski, *et al.* The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca²⁺ plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. J Bioenerg Biomembr, v.28, n.6, Dec, p.523-9. 1996.

Chajes, V., M. Cambot, *et al.* Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. Cancer Res, v.66, n.10, May 15, p.5287-94. 2006.

Chen, Y., E. Mcmillan-Ward, *et al.* Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. Cell Death Differ, v.15, n.1, Jan, p.171-82. 2008.

Chirala, S. S., H. Chang, *et al.* Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.11, May 27, p.6358-63. 2003.

Chirala, S. S., A. Jayakumar, *et al.* Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.6, Mar 13, p.3104-8. 2001.

Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J, v.341 (Pt 2), Jul 15, p.233-49. 1999.

Datta, S. R., A. Brunet, *et al.* Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev, v.13, n.22, Nov 15, p.2905-27. 1999.

Dowling, S., J. Cox, *et al.* Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. Lipids, v.44, n.6, Jun, p.489-98. 2009.

Du, C., M. Fang, *et al.* Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell, v.102, n.1, Jul 7, p.33-42. 2000.

Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol, v.35, n.4, p.495-516. 2007.

Epstein, J. I., M. Carmichael, *et al.* OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. Urology, v.45, n.1, Jan, p.81-6. 1995.

Fagian, M. M., L. Pereira-Da-Silva, *et al.* Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus prooxidants. J Biol Chem, v.265, n.32, Nov 15, p.19955-60. 1990.

Fiers, W., R. Beyaert, *et al.* More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. Oncogene, v.18, n.54, Dec 16, p.7719-30. 1999.

Fukuda, H., N. Iritani, *et al.* Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene by insulin/glucose, polyunsaturated fatty acid and leptin in hepatocytes and adipocytes in normal and genetically obese rats. Eur J Biochem, v.260, n.2, Mar, p.505-11. 1999.

Furuya, Y., S. Akimoto, *et al.* Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. Anticancer Res, v.17, n.6D, Nov-Dec, p.4589-93. 1997.

- Gansler, T. S., W. Hardman, 3rd, *et al.* Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. Hum Pathol, v.28, n.6, Jun, p.686-92. 1997.
- Garrido, C., L. Galluzzi, *et al.* Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ, v.13, n.9, Sep, p.1423-33. 2006.
- Goping, I. S., M. Barry, *et al.* Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. Immunity, v.18, n.3, Mar, p.355-65. 2003.
- Green, D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. Cell, v.121, n.5, Jun 3, p.671-4. 2005.
- Green, D. R. e G. Kroemer. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science, v.305, n.5684, Jul 30, p.626-9. 2004.
- Green, D. R. e J. C. Reed. Mitochondria and apoptosis. Science, v.281, n.5381, Aug 28, p.1309-12. 1998.
- Gross, A., J. M. McDonnell, *et al.* BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev, v.13, n.15, Aug 1, p.1899-911. 1999.
- Guerciolini, R. Mode of action of orlistat. Int J Obes Relat Metab Disord, v.21 Suppl 3, Jun, p.S12-23. 1997.
- Gunter, T. E., D. I. Yule, *et al.* Calcium and mitochondria. FEBS Lett, v.567, n.1, Jun 1, p.96-102. 2004.
- Halestrap, A. P., G. P. Mcstay, *et al.* The permeability transition pore complex: another view. Biochimie, v.84, n.2-3, Feb-Mar, p.153-66. 2002.
- Halliwell, B. e J. M. Gutteridge. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. FEBS Lett, v.307, n.1, Jul 27, p.108-12. 1992.
- Hata, T., Y. Sano, *et al.* Study of new antifungal antibiotic. Jpn. J. Bacteriol, v.15, p.1075-1077. 1960.
- Heemers, H., B. Maes, *et al.* Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. Mol Endocrinol, v.15, n.10, Oct, p.1817-28. 2001.
- Heiligtag, S. J., R. Bredehorst, *et al.* Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. Cell Death Differ, v.9, n.9, Sep, p.1017-25. 2002.

Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. Nature, v.407, n.6805, Oct 12, p.770-6. 2000.

Holden, M. J. e H. Sze. Effects of Helminthosporium maydis Race T Toxin on Electron Transport in Susceptible Corn Mitochondria and Prevention of Toxin Actions by Dicyclohexylcarbodiimide. Plant Physiol, v.91, n.4, Dec, p.1296-1302. 1989.

Horton, J. D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. Biochem Soc Trans, v.30, n.Pt 6, Nov, p.1091-5. 2002.

Igney, F. H. e P. H. Krammer. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer, v.2, n.4, Apr, p.277-88. 2002.

Inada, N. M., K. G. Zecchin, *et al.* Mitochondrial oxidative stress and permeability transition: Tumor cell death, immune response and dyslipidemias. Free Radical Pathophysiology, p.207-222. 2008.

Innocenzi, D., P. L. Alo, *et al.* Fatty acid synthase expression in melanoma. J Cutan Pathol, v.30, n.1, Jan, p.23-8. 2003.

Ishikawa, T., S. S. Zhang, *et al.* DNA repair and cancer: lessons from mutant mouse models. Cancer Sci, v.95, n.2, Feb, p.112-7. 2004.

Jackowski, S., J. Wang, *et al.* Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells. Biochim Biophys Acta, v.1483, n.3, Jan 31, p.301-15. 2000.

Jayakumar, A., M. H. Tai, *et al.* Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.19, Sep 12, p.8695-9. 1995.

Jiang, P., W. Du, *et al.* The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. Mol Cell Biol, v.26, n.23, Dec, p.9071-82. 2006.

Joza, N., S. A. Susin, *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature, v.410, n.6828, Mar 29, p.549-54. 2001.

Kadenbach, B., S. Arnold, *et al.* The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. Biochim Biophys Acta, v.1655, n.1-3, Apr 12, p.400-8. 2004.

Kapur, P., D. Rakheja, *et al.* Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. Mod Pathol, v.18, n.8, Aug, p.1107-12. 2005.

Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. EMBO Rep, v.2, n.4, Apr, p.282-6. 2001.

Klingenberg, M. e D. R. Nelson. Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier. Biochim Biophys Acta, v.1187, n.2, Aug 30, p.241-4. 1994.

Knowles, L. M., F. Axelrod, *et al.* A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. J Biol Chem, v.279, n.29, Jul 16, p.30540-5. 2004.

Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, *et al.* The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. Nature, v.427, n.6973, Jan 29, p.461-5. 2004.

Komarov, P. G., E. A. Komarova, *et al.* A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. Science, v.285, n.5434, Sep 10, p.1733-7. 1999.

Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, *et al.* Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. J Biol Chem, v.271, n.6, Feb 9, p.2929-34. 1996.

Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, *et al.* Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett, v.495, n.1-2, Apr 20, p.12-5. 2001.

Kowaltowski, A. J., N. C. De Souza-Pinto, *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med, v.47, n.4, Aug 15, p.333-43. 2009.

Kowaltowski, A. J., L. E. Netto, *et al.* The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. J Biol Chem, v.273, n.21, May 22, p.12766-9. 1998.

Kowaltowski, A. J. e A. E. Vercesi. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Radic Biol Med, v.26, n.3-4, Feb, p.463-71. 1999.

Kridel, S. J., F. Axelrod, *et al.* Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. Cancer Res, v.64, n.6, Mar 15, p.2070-5. 2004.

Kroemer, G., B. Dallaporta, *et al.* The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. Annu Rev Physiol, v.60, p.619-42. 1998.

Kroemer, G., L. Galluzzi, *et al.* Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev, v.87, n.1, Jan, p.99-163. 2007.

Kroemer, G., L. Galluzzi, *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ, v.16, n.1, Jan, p.3-11. 2009.

Krontiras, H., G. D. Roye, *et al.* Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. Head Neck, v.21, n.4, Jul, p.325-9. 1999.

Kuhajda, F. P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. Nutrition, v.16, n.3, Mar, p.202-8. 2000.

Kuhajda, F. P., E. S. Pizer, *et al.* Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.7, Mar 28, p.3450-4. 2000.

Kumar-Sinha, C., K. W. Ignatoski, *et al.* Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. Cancer Res, v.63, n.1, Jan 1, p.132-9. 2003.

Kusakabe, T., A. Nashimoto, *et al.* Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. Histopathology, v.40, n.1, Jan, p.71-9. 2002.

Lacasa, D., X. Le Liepvre, *et al.* Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. J Biol Chem, v.276, n.15, Apr 13, p.11512-6. 2001.

Lebel, C. P., H. Ischiropoulos, *et al.* Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol, v.5, n.2, Mar-Apr, p.227-31. 1992.

Lemasters, J. J., A. L. Nieminen, *et al.* The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochim Biophys Acta, v.1366, n.1-2, Aug 10, p.177-96. 1998.

Lenartowicz, E., P. Bernardi, *et al.* Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. J Bioenerg Biomembr, v.23, n.4, Aug, p.679-88. 1991.

Levin, M. S., V. D. Talkad, *et al.* Trafficking of exogenous fatty acids within Caco-2 cells. J Lipid Res, v.33, n.1, Jan, p.9-19. 1992.

Li, J. N., M. Gorospe, *et al.* Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. Cancer Res, v.61, n.4, Feb 15, p.1493-9. 2001.

Li, W., A. Sanki, *et al.* The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. Pathology, v.38, n.4, Aug, p.287-301. 2006.

Liu, S. S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. Biosci Rep, v.17, n.3, Jun, p.259-72. 1997.

Liu, X., C. N. Kim, *et al.* Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell, v.86, n.1, Jul 12, p.147-57. 1996.

Liu, X., Y. Shi, *et al.* Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA-MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis. Mol Cancer Ther, v.5, n.3, Mar, p.494-501. 2006.

Loftus, T. M., D. E. Jaworsky, *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. Science, v.288, n.5475, Jun 30, p.2379-81. 2000.

Lorenzo, H. K., S. A. Susin, *et al.* Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. Cell Death Differ, v.6, n.6, Jun, p.516-24. 1999.

Lupu, R. e J. A. Menendez. Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators? Endocrinology, v.147, n.9, Sep, p.4056-66. 2006.

Mcconkey, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. Toxicol Lett, v.99, n.3, Nov 12, p.157-68. 1998.

Mcgowan, C. H. Running into problems: how cells cope with replicating damaged DNA. Mutat Res, v.532, n.1-2, Nov 27, p.75-84. 2003.

Menendez, J. A., R. Colomer, *et al.* Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? Med Hypotheses, v.64, n.2, p.342-9. 2005c.

Menendez, J. A., L. Vellon, *et al.* Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. Ann Oncol, v.16, n.8, Aug, p.1253-67. 2005a.

Menendez, J. A., L. Vellon, *et al.* Orlistat: from antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB-2)-overexpressing gastrointestinal tumors? Exp Biol Med (Maywood), v.230, n.3, Mar, p.151-4. 2005b.

Menendez, J. A., L. Vellon, *et al.* Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.29, Jul 20, p.10715-20. 2004.

Migita, T., S. Ruiz, *et al.* Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. J Natl Cancer Inst, v.101, n.7, Apr 1, p.519-32. 2009.

Milgram, L. Z., L. A. Witters, *et al.* Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. Clin Cancer Res, v.3, n.11, Nov, p.2115-20. 1997.

Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, v.191, Jul 8, p.144-8. 1961.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

Nelson, L. D. e Cox, M. M. Lehninger princípios de bioquímica. v.1, p.975. 2004.

Nemoto, T., S. Terashima, *et al.* Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. Pathobiology, v.69, n.6, p.297-303. 2001.

Nicholls, D. G. e S. J. Ferguson. Proton current and respiratory control. in: Bioenergetics. p.69-75. 2002.

Omura, S. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. Bacteriol Rev, v.40, n.3, Sep, p.681-97. 1976.

Ookhtens, M., R. Kannan, *et al.* Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. Am J Physiol, v.247, n.1 Pt 2, Jul, p.R146-53. 1984.

Ouyang, Y. B. e R. G. Giffard. Changes in astrocyte mitochondrial function with stress: effects of Bcl-2 family proteins. Neurochem Int, v.45, n.2-3, Jul-Aug, p.371-9. 2004.

Payne, C. M., C. Weber, *et al.* Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. Carcinogenesis, v.28, n.1, Jan, p.215-22. 2007.

Pemble, C. W. T., L. C. Johnson, *et al.* Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. Nat Struct Mol Biol, v.14, n.8, Aug, p.704-9. 2007.

Petronilli, V., D. Penzo, *et al.* The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. J Biol Chem, v.276, n.15, Apr 13, p.12030-4. 2001.

Piyathilake, C. J., A. R. Frost, *et al.* The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. Hum Pathol, v.31, n.9, Sep, p.1068-73. 2000.

Pizer, E. S., F. J. Chrest, *et al.* Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. Cancer Res, v.58, n.20, Oct 15, p.4611-5. 1998.

Pizer, E. S., C. Jackisch, *et al.* Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. Cancer Res, v.56, n.12, Jun 15, p.2745-7. 1996a.

Pizer, E. S., B. R. Pflug, *et al.* Increase fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen independent prostate cancer progression Proceedings of the American Association for Cancer Research, v.41, p.655. 2000b.

Pizer, E. S., B. R. Pflug, *et al.* Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. Prostate, v.47, n.2, May 1, p.102-10. 2001.

Pizer, E. S., J. Thupari, *et al.* Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. Cancer Res, v.60, n.2, Jan 15, p.213-8. 2000a.

Pizer, E. S., F. D. Wood, *et al.* Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. Cancer Res, v.56, n.6, Mar 15, p.1189-93. 1996b.

Polster, B. M. e G. Fiskum. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. J Neurochem, v.90, n.6, Sep, p.1281-9. 2004.

Porter, A. G. e R. U. Janicke. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell Death Differ, v.6, n.2, Feb, p.99-104. 1999.

Rangan, V. S., A. K. Joshi, *et al.* Mapping the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation in vitro. Biochemistry, v.40, n.36, Sep 11, p.10792-9. 2001.

Ravagnan, L., T. Roumier, *et al.* Mitochondria, the killer organelles and their weapons. J Cell Physiol, v.192, n.2, Aug, p.131-7. 2002.

Reed, J. C. Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. Nat Clin Pract Oncol, v.3, n.7, Jul, p.388-98. 2006.

Robinson, J. e J. M. Cooper. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. Anal Biochem, v.33, n.2, Feb, p.390-9. 1970.

Ross, J. S., G. P. Linette, *et al.* Breast cancer biomarkers and molecular medicine. Expert Rev Mol Diagn, v.3, n.5, Sep, p.573-85. 2003.

Rossi, S., E. Graner, *et al.* Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. Mol Cancer Res, v.1, n.10, Aug, p.707-15. 2003.

Rossi, S., W. Ou, *et al.* Gastrointestinal stromal tumours overexpress fatty acid synthase. J Pathol, v.209, n.3, Jul, p.369-75. 2006.

Samudio, I., R. Harmancey, *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. J Clin Invest, v.120, n.1, Jan, p.142-56.

Scorrano, L. e S. J. Korsmeyer. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. Biochem Biophys Res Commun, v.304, n.3, May 9, p.437-44. 2003.

Sharikabad, M. N., K. M. Ostbye, *et al.* Effect of extracellular Mg(2+) on ROS and Ca(2+) accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.280, n.1, Jan, p.H344-53. 2001.

Siliprandi, D., G. Scutari, *et al.* Action of 'diamide' on some energy linked processes of rat liver mitochondria. FEBS Lett, v.42, n.2, Jun 1, p.197-9. 1974.

Silva, S. D., M. Agostini, *et al.* Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. Oral Oncol, v.40, n.7, Aug, p.688-96. 2004.

Silva, S. D., I. W. Cunha, *et al.* Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. Virchows Arch, v.453, n.1, Jul, p.57-67. 2008.

Smith, S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. Faseb J, v.8, n.15, Dec, p.1248-59. 1994.

Smith, S., A. Witkowski, *et al.* Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. Prog Lipid Res, v.42, n.4, Jul, p.289-317. 2003.

Stoops, J. K. e S. J. Wakil. Animal fatty acid synthetase. A novel arrangement of the beta-ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. J Biol Chem, v.256, n.10, May 25, p.5128-33. 1981.

Susin, S. A., H. K. Lorenzo, *et al.* Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. J Exp Med, v.189, n.2, Jan 18, p.381-94. 1999.

Sutton, V. R., M. E. Wowk, *et al.* Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. Immunity, v.18, n.3, Mar, p.319-29. 2003.

Suzuki, Y., Y. Imai, *et al.* A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. Mol Cell, v.8, n.3, Sep, p.613-21. 2001.

Swinnen, J. V., M. Esquenet, *et al.* Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. Cancer Res, v.57, n.6, Mar 15, p.1086-90. 1997a.

Swinnen, J. V., H. Heemers, *et al.* Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. Oncogene, v.19, n.45, Oct 26, p.5173-81. 2000.

Swinnen, J. V., T. Roskams, *et al.* Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. Int J Cancer, v.98, n.1, Mar 1, p.19-22. 2002.

Swinnen, J. V., W. Ulrix, *et al.* Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.24, Nov 25, p.12975-80. 1997b.

Takahashi, A., A. Masuda, *et al.* Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). Brain Res Bull, v.62, n.6, Feb 15, p.497-504. 2004.

Takahiro, T., K. Shinichi, *et al.* Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. Clin Cancer Res, v.9, n.6, Jun, p.2204-12. 2003.

Tsukamoto, Y., H. Wong, *et al.* The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. J Biol Chem, v.258, n.24, Dec 25, p.15312-22. 1983.

Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol, v.552, n.Pt 2, Oct 15, p.335-44. 2003.

Valle, V. G., M. M. Fagian, *et al.* The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. Arch Biochem Biophys, v.307, n.1, Nov 15, p.1-7. 1993.

Van De Sande, T., E. De Schrijver, *et al.* Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. Cancer Res, v.62, n.3, Feb 1, p.642-6. 2002.

Van Loo, G., P. Schotte, *et al.* Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. Cell Death Differ, v.8, n.12, Dec, p.1136-42. 2001.

Vercesi, A. E. Mitocôndria ATP, calor e morte celular. Ciência Hoje, v.34, p.16-23. 2003.

Vercesi, A. E., A. J. Kowaltowski, *et al.* Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. Front Biosci, v.11, p.2554-64. 2006.

Verhagen, A. M., P. G. Ekert, *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell, v.102, n.1, Jul 7, p.43-53. 2000.

Visca, P., P. L. Alo, *et al.* Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. Clin Cancer Res, v.5, n.12, Dec, p.4111-8. 1999.

Visca, P., V. Sebastiani, *et al.* Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. Anticancer Res, v.23, n.1A, Jan-Feb, p.335-9. 2003.

Vlad, L. D., C. A. Axiotis, *et al.* Fatty Acid Synthase is Highly Expressed in Aggressive Thyroid Tumors. Mod. Pathol., v.12, p.70. 1999.

Wakil, S. J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochemistry, v.28, n.11, May 30, p.4523-30. 1989.

Walworth, N. C. Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. Curr Opin Cell Biol, v.12, n.6, Dec, p.697-704. 2000.

Wang, X., M. R. Briggs, *et al.* Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. J Biol Chem, v.268, n.19, Jul 5, p.14497-504. 1993.

Weiss, L., G. E. Hoffmann, *et al.* Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. Biol Chem Hoppe Seyler, v.367, n.9, Sep, p.905-12. 1986.

Westphal, S. e H. Kalthoff. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. Mol Cancer, v.2, Jan 7, p.6. 2003.

Yarden, Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. Oncology, v.61 Suppl 2, p.1-13. 2001.

Yoshida, H. The role of Apaf-1 in programmed cell death: from worm to tumor. Cell Struct Funct, v.28, n.1, Feb, p.3-9. 2003.

Zambell, K. L., M. D. Fitch, *et al.* Acetate and butyrate are the major substrates for de novo lipogenesis in rat colonic epithelial cells. J Nutr, v.133, n.11, Nov, p.3509-15. 2003.

Zamzami, N., S. A. Susin, *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. J Exp Med, v.183, n.4, Apr 1, p.1533-44. 1996.

Zecchin, K. G., M. C. Pereira, *et al.* Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. Calcif Tissue Int, v.76, n.2, Feb, p.136-45. 2005.

Zecchin, K. G., A. L. Seidinger, *et al.* High Bcl-2/Bax ratio in Walker tumor cells protects mitochondria but does not prevent H₂O₂-induced apoptosis via calcineurin pathways. J Bioenerg Biomembr, v.39, n.2, Apr, p.186-94. 2007.

Zhang, J. H., Y. Zhang, *et al.* Caspases, apoptosis and aging. Ageing Res Rev, v.2, n.4, Oct, p.357-66. 2003.

Zhao, W., S. Kridel, *et al.* Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy. Br J Cancer, v.95, n.7, Oct 9, p.869-78. 2006.

Zhou, W., W. F. Han, *et al.* Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. Cancer Res, v.67, n.7, Apr 1, p.2964-71. 2007.

Zimmermann, K. C., C. Bonzon, *et al.* The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther, v.92, n.1, Oct, p.57-70. 2001.

Zoratti, M. e I. Szabo. The mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta, v.1241, n.2, Jul 17, p.139-76. 1995.