



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



MARCO ANTONIO CARVALHO
Cirurgião-dentista

**ANÁLISE DO PAPEL DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE NO PROCESSO
METASTÁTICO DE MELANOMA EM MODELO MURINO (B16F10/C57BL6)**

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

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

**PIRACICABA
2007**

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

C253a Carvalho, Marco Antonio.
Análise do papel da enzima ácido graxo sintase no processo metastático de melanoma em modelo murino (B16F10/C57BL6). / Marco Antonio Carvalho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Edgard Graner.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ácidos graxos. 2. Metástase. 3. Camundongo. I. Graner, Edgard. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Analysis of the role of fatty acid synthase in the metastatic process of melanoma in a murine model (B16F10/C57BL6)

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Fatty acids. 2. Metastasis. 3. Mice

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Carlos Alberto de Souza Costa, Edgard Graner, Marcio Ajudarte Lopes

Data da Defesa: 26-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2007, considerou o candidato MARCO ANTONIO CARVALHO aprovado.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Edgard Graner".

PROF. DR. EDGARD GRANER

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carlos Alberto de Souza Costa".

PROF. DR. CARLOS ALBERTO DE SOUZA COSTA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcio Ajudarte Lopes".

PROF. DR. MARCIO AJUDARTE LOPES

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Sérgio e Olga**, por suas abnegações pessoais em detrimento a felicidade de seus filhos, pelo amor e dedicação e por terem a consciência de que a maior herança deixada a seus descendentes é a educação no seu sentido mais amplo.*

*Aos meus irmãos **Sérgio, Marco Aurélio e Rosângela**, por serem minha referência de dedicação, profissionalismo e honestidade em suas profissões e por nunca deixarem que os percalços da vida me desanimassem.*

*Ao meu irmão **Marcus Vinícius Carvalho** pelas lembranças maravilhosas de nosso convívio.*

“In Memoriam”

*A **Cristiane**, meu grande amor, pelo incentivo e paciência durante todo este tempo e pelo seu otimismo e alto astral nas horas que mais precisei. Minha eterna gratidão.*

Ao meu orientador **Professor Dr. Edgard Graner**, pela condução do meu aprendizado de uma forma tranqüila e serena, me levando a alcançar níveis de conhecimento por mim jamais sonhados. Pela sua dedicação, humildade e capacidade, tornando-se para todos ao seu redor um exemplo. Além de professor e orientador um amigo. Registro assim toda minha admiração e profundo agradecimento.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

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

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**;

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos Profs. **Drs. Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Jacks Jorge Júnior e Oswaldo Di Hipólito Júnior**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por todos os ensinamentos transmitidos;

Em especial aos Profs. Drs. **Jacks Jorge Júnior e Márcio Ajudarte Lopes** pela confiança e apoio desde o início, para que eu pudesse realizar este trabalho sem o qual nada disso seria possível. E por despertar meu interesse pela Patologia, meu profundo agradecimento e respeito;

Ao Prof. Dr. **Oslei Paes de Almeida** pelo apoio irrestrito ao uso das instalações e equipamentos do laboratório do departamento de Estomatopatologia sem o qual muito dos resultados obtidos neste trabalho não seriam possíveis;

A Profa. Dra. **Maria Luíza Cotrin Sartor de Oliveira**, bióloga do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e ao Sr. **Claudinei Figueira**, técnico do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pelos valorosos ensinamentos e colaboração na realização dos cortes por congelamento utilizados neste trabalho;

Ao meu irmão **Marco Aurélio Carvalho** por despertar em mim desde a infância, a paixão pela área de saúde, sendo por mim um exemplo a ser seguido;

Aos meus grandes amigos de faculdade **Fernando Luís de Oliveira, Ricardo Danil Guiraldo e Marcelo Pacheco** pelos momentos de companheirismo, amizade e incentivo desde as primeiras aulas da graduação até hoje;

Aos meus amigos do coração **Alexandre, Helena, Stanley, Flávia, Jorge, Luís Otávio, Luís Fernando, Vera, Sandro, Rodrigo, Meire e Joba** pela amizade verdadeira e momentos de descontração ao longo de tantos anos;

À colega de Mestrado **Lays Martin Sobral**, pela grande amizade construída;

Às colegas de bancada **Michelle Agostini e Ana Lúcia Rangel** pelos ensinamentos das técnicas de laboratório, cultura de células e colaboração nos experimentos deste trabalho;

Aos demais amigos e colegas da pós-graduação **Michele Kellermann, Rebeca, Marcelo, Kenia, Erica, Dawton, Jorge, Guilherme, Francisco, Ademar, Lucielma, Andréia, Eduardo, Patrícia, Lília, Mario, Luís, Alan, Fernanda, Carol, Adriele, Débora e Fabiana** pelos momentos de estudo e diversão compartilhados;

À amiga Profa. Dra. **Karina Gottardelo Zecchin** da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pela valiosa contribuição durante os experimentos de citometria de fluxo.

À Sra. **Ana Cristina do Amaral Godoy**, técnica do laboratório de Patologia, pela sua alegria, amizade e ensinamentos das técnicas histológicas, necessárias para realização deste trabalho;

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

Aos demais funcionários do laboratório de Patologia, **Sr. João Carlos Gomes da Silva Júnior, Rosa Maria Fornasier, Valéria** e aos funcionários e amigos do Orocentro onde comecei esta caminhada **Rogério, Lúcia e Sra. Aparecida Conceição Campion**, pelo auxílio, colaboração e generosidade;

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de bolsa durante o período deste mestrado n° 05/52631-8;

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e incentivaram esta jornada, guardarei sempre lembranças maravilhosas destes momentos.

EPÍGRAFE

*"Mesmo estando na estrada certa, você será atropelado se ficar apenas
sentado nela."*

Will Rogers

O melanoma é, dentre as neoplasias de pele, a de pior prognóstico devido ao seu alto índice de metástases. A ácido graxo sintase (FAS) é uma enzima metabólica formada por um homodímero com massa molecular aproximada de 250 kDa responsável pela síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Sua expressão é baixa em tecidos normais e alta em muitos tumores malignos, nos quais parece estar associada com um pior prognóstico para o paciente, como ocorre nos melanomas. Existem evidências que, nas células malignas, a atividade de FAS é necessária para a produção de fosfolípidios que compõem as membranas celulares. Inibidores específicos da atividade de FAS bloqueiam a síntese de DNA e causam apoptose em linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas de próstata, mama e cólon. A droga Orlistat (Xenical®), usada para tratamento de obesidade, foi recentemente descrita como tendo propriedades anti-neoplásicas em câncer de próstata e mama, devido à sua capacidade de bloquear especificamente a atividade de FAS. Este trabalho teve como objetivo principal estudar o efeito da inibição da enzima FAS em células B16F10 e em um modelo experimental de metástases espontâneas de melanoma em camundongos. O tratamento de camundongos portadores de melanomas intraperitoneais causados pela injeção de células B16F10 com Orlistat reduziu em 50% o número de metástases espontâneas para os linfonodos mediastínicos. Experimentos de citometria de fluxo mostraram que o tratamento da linhagem celular B16F10 com Orlistat inibe a proliferação devido ao acúmulo de células em G0/G1 e bloqueio da passagem para a fase S, que foi confirmado por um aumento na quantidade da proteína p27^{Kip1} e concomitante redução de Skp2. Através de ensaios de marcação com Anexina-V, observamos que Orlistat provoca um aumento na taxa de apoptose destas mesmas células. O presente modelo animal de metástases de melanoma mostrou-se útil para o estudo de drogas com potencial efeito anti-tumoral, como o Orlistat. A inibição da atividade de FAS tem

um importante papel na disseminação metastática de melanomas de camundongos, possivelmente por inibir a proliferação e provocar apoptose nas células B16F10.

Palavras chave: melanoma / ácido graxo sintase / metástase / Orlistat / células B16-F10 / camundongo

ABSTRACT

Malignant melanoma is a cancer with poor prognosis due to its high metastatic potential and resistance to the existing chemotherapeutic agents. Fatty acid synthase is a metabolic enzyme with molecular mass of 250 kDa responsible for the endogenous biosynthesis of fatty acids. FAS converts acetyl-CoA and malonyl-CoA in the long chain fatty acid palmitate. FAS activity is downregulated in most normal human tissues except liver, adipose tissue, fetal lung and lactating breast. On the other hand, FAS is overexpressed in several malignant neoplasms, including malignant melanoma. For some tumors, FAS overexpression has been associated with a poor prognosis. Recently, the new inhibitor of FAS activity Orlistat was shown to inhibit the proliferation of prostate and breast cancer cell lines and the growth of their xenograft tumors. In this work we studied the effects of FAS inhibition in the B16F10 melanoma cell line and in a animal model for melanoma metastasis. B16F10 murine melanoma cells were intraperitoneally injected in 40 mice and an inhibition of 50% in the number of mediastinal lymph node metastasis was observed in the Orlistat treated group. The inhibition of FAS was confirmed by "Oil Red O" staining in frozen tissue sections. We also found that Orlistat promoted apoptosis and inhibited the proliferation of B16F10 cells by blocking cell cycle progression, as demonstrated by flow cytometry experiments. Western blotting analysis of protein extracts obtained from Orlistat-treated cells revealed overexpression of p27^{Kip1} and downregulation of Skp2. In conclusion, the present animal model is useful for the study of drugs with antitumoral effect like Orlistat. The inhibition of FAS has an important role on the metastatic spread of melanoma in C57BL6 mice by blocking the proliferation and inducing apoptosis in B16F10 cells. In addition, the inhibition of FAS by Orlistat represents a new approach in order to develop drugs for melanoma chemotherapy.

Key words: melanoma / fatty acid synthase / metastasis / Orlistat / B16-F10 cells / mouse

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American type culture collection

DTT - Ditiotietol

DMSO - Di-metil sulfóxido

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

FAS - “Fatty acid synthase” – Ácido graxo sintase

FBS - “Fetal Bovine Serum” - Soro fetal bovino

HE – Hematoxilina e Eosina

IP - Intraperitoneal

kDa - Quilodaltons

NADPH - “Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate” – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

pb - Pares de bases

PBS - “Phosphate Buffered Saline” - Solução salina tamponada com fosfato

PI-3K - “Phosphatidylinositol -3- kinase” - Fosfoinositídeo-3-quinase

PMSF - "Phenylmethylsulfonyl fluoride" - Fenilmetilsulfonil fluoreto

RA - Receptor de Andrógeno

RE – Receptor de Estrógeno

SDS - “Sodium Dodecyl Sulphate” – Dodecil Sulfato de Sódio

STI - “Soybean Trypsin Inhibitor”

VEGF – “Vascular Epidermal Growth Factor” – Fator de Crescimento Epidérmico Vascular

xg – Força centrífuga

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Melanoma	3
2.2. Ácido graxo sintase (FAS)	5
2.3. Regulação da expressão de FAS	8
2.4. Inibidores específicos de FAS	11
2.4.1. Cerulenina	11
2.4.2. C75	11
2.4.3. Orlistat	13
2.5. Efeitos biológicos da inibição da expressão e atividade de FAS	14
2.6. ErbB2 e câncer	15
2.7. p27 ^{Kip1}	16
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Cultura de células	19
4.2. Preparo das soluções de Orlistat	20
4.3. Modelo animal de metástase espontânea de melanoma	20
4.4. Cultura celular a partir do modelo animal	21
4.5. Preparação dos extratos protéicos e reações de western blot	22
4.6. Coloração Oil Red “O” para lipídios	23
4.7. Estudo do efeito do Orlistat sobre o crescimento e morfologia das células B16F10	24
4.8. Extração de melanina das células B16F10	24
4.9. Experimentos para o estudo do ciclo celular e verificação das taxas de apoptose	25
4.10. Análise Estatística	26

5. RESULTADOS	27
5.1. Padronização do modelo animal de metástases espontâneas de melanoma	27
5.2. Estabelecimento de linhagens celulares a partir do modelo animal	29
5.3. Efeito do tratamento com Orlistat sobre a disseminação metastática do melanoma em modelo animal	31
5.4. Análise microscópica	39
5.5. Efeito da inibição de FAS no crescimento das células e melanogênese <i>in vitro</i>	43
5.6. Comprovação da inibição de FAS pelo Orlistat <i>in vivo</i>	47
5.7. Avaliação do efeito do Orlistat sobre o ciclo celular e o índice de apoptose das células B16F10	49
5.8. Expressão de FAS nas linhagens celulares isoladas a partir dos tumores primários e suas respectivas metástases nos linfonodos mediastínicos	52
5.9. Efeito do tratamento com Orlistat sobre a produção de FAS, ErbB2, p27 ^{Kip1} e Skp2 pelas células B16F10	53
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	83
ANEXO I Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal	84
ANEXO II Artigo científico a ser submetido à revista PNAS (Medical Science)	86

1. INTRODUÇÃO

FAS é a enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa (Stoops & Wakil 1981; Kuhajda *et al.*, 2000a; Pizer *et al.*, 2000; Brink *et al.*, 2001; Baron *et al.*, 2004). Em células normais sua atividade é baixa, com exceção dos tecidos lipogênicos como fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões de recém nascidos, pois a maior parte dos ácidos graxos utilizados para a manutenção das células é oriunda da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Kuhajda, 2000b; Menendez *et al.*, 2005a).

Uma vasta literatura têm demonstrado que grandes quantidades de FAS são encontradas em diversos tipos de neoplasias malignas humanas de natureza epitelial, como as de mama (Milgraum *et al.*, 1997), ovário (Alo' *et al.*, 2000), próstata (Swinnen *et al.*, 2002), endométrio (Pizer *et al.*, 1998), tireóide (Vlad *et al.*, 1999), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000), cólon (Visca *et al.*, 1999), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005), bexiga (Visca *et al.*, 2003) e carcinoma espinocelular bucal (Krontiras *et al.*, 1999; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004), bem como em sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2006). Numerosos relatos têm demonstrado uma associação positiva entre a expressão de FAS e o comportamento agressivo de tumores, sendo que sua alta expressão ocorre preferencialmente nos casos com pior prognóstico (Epstein *et al.*, 1995; Alo' *et al.*, 1996; Gansler *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000a), provavelmente porque gera vantagens seletivas para o crescimento celular (Baron *et al.* 2004).

O tratamento de linhagens celulares provenientes de câncer de próstata, mama e carcinomas gastrointestinais, endometriais, de ovário e de mucosa bucal com inibidores específicos da atividade da FAS (cerulenina, C75 ou Orlistat) tem como conseqüência, além da diminuição na síntese de ácidos graxos, o bloqueio do ciclo celular com diminuição da proliferação e um aumento do número de células em apoptose (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*,

2001; Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005b; Menendez *et al.*, 2006). No entanto, os mecanismos biológicos que governam as interações entre a atividade metabólica lipogênica e as moléculas que controlam o ciclo celular ainda não são conhecidos.

Tendo-se em vista que a FAS participa exclusivamente da síntese de ácidos graxos, ela tem sido considerada como um possível alvo terapêutico para a elaboração de novas drogas para o tratamento de diversos tipos de neoplasias malignas (Kuhajda *et al.*, 2000b; Swinnen *et al.*, 2000c; Gabrielson *et al.*, 2001; Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2005c, 2006).

Existem até o presente momento na literatura, dois trabalhos descrevendo, através de reações imunohistoquímicas, a expressão de FAS em melanomas. No primeiro, Innocenzi *et al.* (2003) observaram uma correlação positiva entre expressão de FAS e índice de Breslow (sistema usado para classificação de melanomas, que mede a espessura tumoral da camada celular mais superficial até a maior profundidade do tumor), além de uma correlação inversa entre a presença de FAS nos cortes analisados e a sobrevida total. Em seguida, Kapur *et al.* (2005) avaliaram 155 lesões melanocíticas cutâneas, sendo 30 nevos congênitos, 19 nevos compostos, 40 nevos de Spitz, 48 melanomas primários e 18 melanomas metastáticos. A expressão de FAS foi mais intensa em melanomas primários em comparação com os nevos convencionais e nevos de Spitz e a maior intensidade de marcação para FAS foi encontrada nos tumores metastáticos. Estes autores relataram também que a expressão de FAS nos nevos congênitos foi semelhante aos dos melanomas metastáticos e sugeriram que uso de inibidores de FAS poderia ser um alvo terapêutico para o tratamento de nevos congênitos grandes, impossíveis de serem ressecados cirurgicamente.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da inibição específica de FAS pela droga Orlistat em culturas de células derivadas de um melanoma murino (B16F10) e em melanomas experimentais desenvolvidos em camundongos C57BL6.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Melanoma

Melanomas são neoplasias malignas originárias a partir de lesões melanocíticas pré-existentes ou desenvolvem em pele ou mucosa normais (*de novo*). Os melanócitos são células provenientes da crista neural que migram para a pele, retina, meninges e mucosas oronasal e respiratória entre a 12^o e 14^o semana de vida intra-uterina (Quevedo & Fleischmann, 1980; Nordlund, 1986; Erickson, 1993). Eles se localizam na camada basal da pele e possuem núcleo irregular e central e citoplasma globoso, de onde partem prolongamentos que mantêm contato com queratinócitos da própria camada basal. A melanina atua como importante filtro endógeno contra os raios ultravioletas presentes na luz solar e sua síntese ocorre no interior dos melanócitos, tendo a tirosina como precursor (Jimbow *et al.*, 1993).

Dentre as neoplasias de pele, o melanoma é a de pior prognóstico. Seu alto índice de mortalidade deve-se principalmente à emissão de metástases para diversos órgãos como fígado, pulmões, cérebro, ossos, ovário, estômago, pâncreas e intestino delgado (Hawes *et al.*, 2001; Rodolfo *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 2004; Atallah & Flaherty, 2005; Katz *et al.*, 2005; McWilliams *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Belagyi *et al.*, 2006). É o quinto tipo de câncer mais freqüente nos Estados Unidos, com taxas de incidência e mortalidade crescentes, as quais de 1973 a 1994 aumentaram 120,5% e 38,9% respectivamente (Hall *et al.*, 1999). Neste mesmo país, é o tipo de câncer mais comum em mulheres entre 25 e 29 anos e o segundo mais comum entre 30 e 34 anos, depois do câncer de mama (Rigel *et al.* 1996). Em todo o mundo, durante todo o ano de 2002, houve 160.000 novos casos de melanoma com 40.000 mortes (International Agency for Research Câncer - www-dep.iarc.fr/globocan). Na Austrália, em muitos países europeus e na América do Norte houve um aumento de 5% ao ano nos casos de melanoma nos

últimos 40 anos (Thompson *et al.*, 2005). Segundo a AIHW (Australian Institute of Health and Welfare), a Austrália foi o país com maior incidência mundial de melanoma em homens e o segundo em mulheres. No Brasil, segundo as estimativas do INCA para 2006, é esperado um total de 5.760 novos casos de melanoma entre homens e mulheres, com maior porcentagem na região sul do país (INCA, 2006). Cerca de 91,2% dos casos de melanoma afetam a pele, 5,3% os olhos, 2,2% apresentam local primário indeterminado e 1,3% afetam as mucosas, dos quais 55,4% ocorrem na região de cabeça e pescoço. Os melanomas primários da cavidade oral são raros e correspondem a menos de 1,2 casos em cada 10 milhões de pessoas por ano, afetando mais comumente o palato, seguido pela gengiva, mucosa jugal, lábios e rebordo alveolar (Hicks & Flaitz, 2000). No estágio inicial da doença, que se caracteriza por um crescimento radial, o melanoma é tratado por excisão cirúrgica, tendo o índice de Breslow (distância em milímetros desde a camada nucleada mais superficial até o nível mais profundo de invasão) e de Clark (correlaciona o nível anatômico de invasão associado ao índice mitótico) como fatores prognósticos da doença (Chin *et al.*, 1998; 2003). O melanoma é um grave problema de saúde, não apenas pela sua incidência ou por afetar adultos jovens, mais pelo seu alto potencial metastático e por ser pouco sensível à radioterapia e aos quimioterápicos atualmente conhecidos (revisado por Li *et al.*, 2006). A sobrevida média para pacientes com lesões metastáticas é de 13,6% em 2 anos, 9,7% em 3 anos e apenas 2% em 5 anos (Lee *et al.*, 2000).

Fatores associados à radiação UV, tais como grau de pigmentação da pele, índice de exposição à radiação ultravioleta, efeitos mutagênicos diretos no DNA, indução da produção de fatores de crescimento pelas células da pele, redução da imunidade e estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio estão associados à etiologia dos melanomas (MacKie *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005). Por outro lado, existem melanomas não associados aos raios UV, os quais têm histórico familiar ou estão relacionados com a quantidade e

tipos de *nevus* pré-existentes (revisado por Li *et al.*, 2006). Dentre os genes associados à progressão do melanoma podemos citar aqueles que codificam proteínas controladoras do ciclo celular, como p16 (CDKN2A), localizado no cromossomo 9p21 e responsável pela expressão das proteínas p16^{INK4a} e p14^{ARF} (Walker *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 2003). p16^{INK4a} é responsável pela inibição da formação do complexo enzimático CDK4/CDK6/ciclina D, necessário para a fosforilação da proteína Rb e entrada da célula na fase S do ciclo celular. p14^{ARF} tem como função estabilizar a proteína p53, prevenindo sua degradação mediada por HMD2 (human double minute 2). Na ausência de p14^{ARF}, a proteína HMD2 (ligase de ubiquitina específica para p53) conduz p53 a degradação pelos proteossomos (Kamijo *et al.*, 1998). Outra alteração associada a etiologia do melanoma ocorre no gene CCND1, localizado no cromossomo 11q13 e responsável pela expressão da ciclina D1, que atua regulando positivamente o ciclo celular (Utikal *et al.*, 2005). Mutações nos genes que codificam as proteínas da família *ras* e as serina/treonina quinases *raf*, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF/SF) e seu receptor c-MET, assim como as proteínas supressoras tumorais PTEN, p53, p27^{Kip1} e p21 também já foram descritas em melanomas (Chin, 2003; Chudnovsky *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

2.2. Ácido graxo sintase (FAS)

FAS é um complexo enzimático multifuncional que possui sete sítios catalíticos e um grupo prostético 4'-fosfopanteteína, responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA (Stoops & Wakil 1981; Tsukamoto *et al.*, 1983; Brink *et al.*, 2001; Chirala *et al.*, 2001; Rangan *et al.*, 2001; Baron *et al.*, 2004). Do ponto de vista estrutural, FAS é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas longas, com massa molecular de aproximadamente 250 kDa (Figura I). Os sete sítios catalíticos que compõem a FAS estão distribuídos a partir da extremidade amino terminal em direção a carboxil terminal na seguinte ordem: β -

cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transacilases que funcionam como sítios de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para a subsequente reação de condensação; na seqüência, desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase e proteína carregadora de acil atuam como redutores, sobre o produto formado pela β -cetoacil sintase; por fim, o sítio tioesterase localizado na região carboxil terminal promove a hidrólise do palmitato, que é liberado como a molécula de ácido graxo recém sintetizada (Wakil, 1989; Jayakumar *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2003). Sua atividade é mínima em tecidos normais, exceto em tecidos lipogênicos, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos usados pelas células provém da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Menendez *et al.*, 2005a). Desta forma, a expressão de FAS é baixa ou mesmo ausente na maioria dos tecidos humanos adultos normais (Weiss *et al.*, 1986), com exceção do fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e dos pulmões de recém nascidos para a produção da substância surfactante (Kuhajda, 2000; Chirala *et al.*, 2001). Ao contrário, nas células de neoplasias malignas a maior parte dos ácidos graxos provém da síntese endógena, através da atividade de FAS. A expressão de FAS está aumentada em diversos tipos de neoplasias malignas humanas de natureza epitelial, como as de mama (Milgraum *et al.*, 1997), ovário (Alò *et al.*, 2000), próstata (Swinnen *et al.*, 2002), endométrio (Pizer *et al.*, 1998), tireóide (Vlad *et al.*, 1999), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000), colon (Visca *et al.*, 1999), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur, *et al.*, 2005), bexiga (Visca *et al.*, 2003) e carcinoma espinocelular bucal (Krontiras *et al.*, 1999, Agostini *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2004), bem como em sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2006). Numerosos relatos têm demonstrado uma associação positiva entre a expressão de FAS e o comportamento agressivo de tumores malignos, sendo que sua alta expressão ocorre frequentemente nos casos com pior prognóstico (Epstein *et al.*, 1995; Alo *et al.*, 1996; Gansler *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000b). A alta atividade desta via anabólica deve gerar vantagens para o

rápido crescimento celular deste tipo de neoplasia (Baron *et al.*, 2004). Em melanomas observou-se uma correlação positiva entre expressão de FAS e índice de Breslow, além de uma correlação inversa entre FAS e a sobrevida total, indicando que a alta expressão de FAS está associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e conseqüentemente pior prognóstico (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005).

Apesar das evidências apontando a síntese endógena de ácidos graxos como essencial para a proliferação de células malignas, não se conhece até o momento quais os mecanismos biológicos envolvidos. Neste contexto, Swinnen *et al.* (2003) demonstraram que a atividade de FAS é necessária para a produção dos fosfolipídios que compõe as membranas das células LNCaP (uma linhagem celular derivada de um adenocarcinoma de próstata metastático). Isto pode causar, além de um aumento na velocidade da produção das membranas celulares, alterações na sua composição lipídica, com profundos efeitos em várias vias de transdução de sinais (Baron *et al.*, 2004).

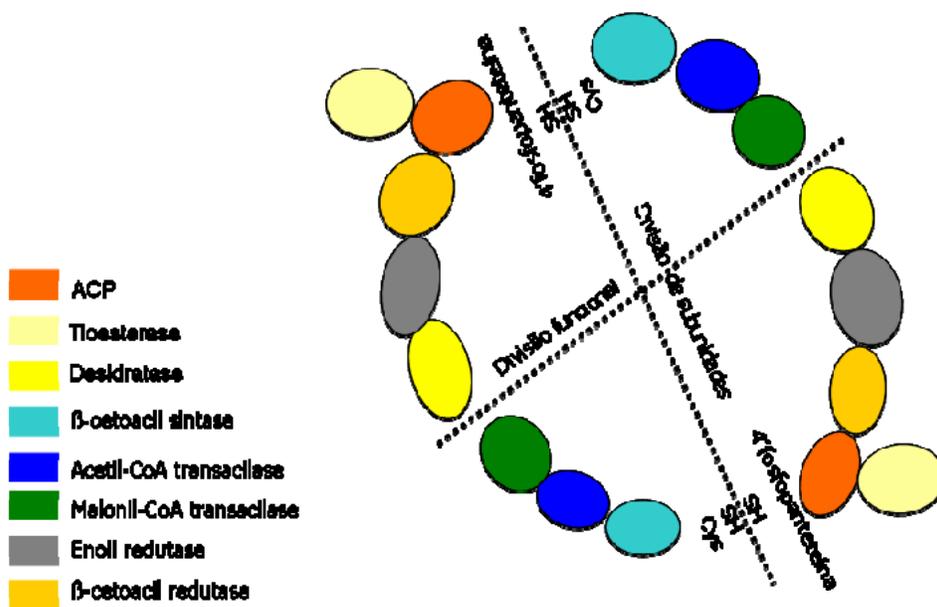


Figura 1 – Representação esquemática da FAS, homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas longas, com massa molecular de aproximadamente 250 kDa. Em cada cadeia existem sete sítios catalíticos distintos e um sítio para a proteína carregadora de acil (ACP). Modificado de Wakil SJ, 1989.

2.3. Regulação da expressão de FAS

A expressão de FAS no fígado e no tecido adiposo é regulada pela dieta, através de hormônios como a insulina, glucagon, glicocorticóides e hormônio tireoideano (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 tem o potencial de estimular (insulina) ou inibir (leptina) a lipogênese dependente de FAS. A insulina estimula a expressão de FAS fazendo com que o excesso de glicose seja estocado como gordura nos adipócitos, em contrapartida, a leptina é um hormônio que inibe a FAS em resposta ao excesso de gordura nos adipócitos (Fukuda *et al.*, 1999). Nos hepatócitos, além da regulação promovida pelos hormônios já citados, a presença de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta promovem a diminuição de SREBP-1c, responsável pela regulação da síntese de colesterol (Horton, 2002; Brown & Goldstein, 1997, 1999). As SREBPs constituem 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 e independente da alimentação (Sabine *et al.*, 1967; Ookhtens *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1986; Menendez *et al.*, 2005a). Alterações metabólicas nas células malignas são sugeridas desde 1924, quando Warburg & Posener observaram o aumento da glicólise anaeróbica (Kuhajda *et al.*, 2006). Somente em 1953 foi descrito que a síntese de ácidos graxos estava aumentada em tecidos neoplásicos, em comparação com os tecidos normais (Medes *et al.*, 1953). A regulação da expressão de FAS em tumores malignos começou a ser intensamente investigada a partir da década de 80, em linhagens celulares derivadas de câncer de mama. Chabos *et al.* (1987) demonstraram que o

tratamento com progestinas leva a um aumento tanto da expressão como da atividade de FAS em células de câncer de mama (MCF7 e T47D). De maneira semelhante, o tratamento com andrógenos aumentou a expressão de FAS em linhagens celulares derivadas de câncer de mama e próstata (Chambon *et al.*, 1989; Swinnen *et al.*, 1997). Kumar-Sinha *et al.* (2003) demonstraram, em células derivadas da glândula mamária, genes diferencialmente regulados por ErbB2. Através de experimentos de “microarrays”, estes autores observaram uma conexão direta entre o gene que codifica a FAS e ErbB2, através da via PI-3K, que tem ação direta sobre o promotor da FAS. Segundo estes autores, a inibição da atividade da FAS em linhagens celulares derivadas de câncer de mama causa apoptose preferencialmente nas células que estão expressando ErbB2 em grandes quantidades. Em recente estudo, Menendez *et al.* (2004) mostraram que FAS regula a expressão e atividade deste mesmo receptor de superfície em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário. Estes mesmos autores demonstraram que a inibição de FAS causa diminuição dos níveis de ErbB2 e leva a um aumento dos níveis de PEA-3, um fator de transcrição que se liga especificamente ao promotor de ErbB2 em células SK-Br3, derivadas de câncer de mama (Menendez *et al.*, 2005).

Em tumores sensíveis a hormônios, estrógeno, progesterona e andrógenos desempenham um papel claro na regulação da FAS (Kuhajda, 2000). Está demonstrado que progesterona estimula a expressão de FAS em linhagens celulares de câncer de mama (Lacasa *et al.*, 2001), enquanto andrógenos e o fator de crescimento epidérmico (EGF) aumentam a expressão e a atividade de FAS em linhagem celular de câncer de próstata (LNCaP) (Swinnen *et al.*, 1997a), o que acontece através das proteínas SREBPs (Swinnen *et al.* 1997b).

Andrógenos (testosterona e seu metabólito ativo 5 α -dihidrotestosterona) são hormônios esteróides importantes na expressão do fenótipo masculino (Brinkmann, 2001) e que modulam a função fisiológica de vários outros órgãos, como a próstata e o epidídimo, assim como em tecido muscular, folículos pilosos e

cérebro (Lee & Chang, 2003). Em homens, os andrógenos são produzidos pelos testículos e seus precursores androgênicos em grande parte são produzidos nas glândulas supra-renais, sendo transformados em testosterona nos tecidos periféricos (Berne & Levy, 1998). O receptor de andrógeno (RA) é um fator de transcrição que regula a expressão dos genes necessários ao desenvolvimento sexual normal em homens (O'malley, 1990; Truss & Beato, 1993). Alterações nas vias de sinalização dos andrógenos têm sido relacionadas à infertilidade masculina e ao câncer de próstata (Lee & Chang, 2003). A regulação de transcrição da FAS através de andrógenos, em linhagens celulares de câncer de próstata, ocorre pela estimulação da expressão do fator de transcrição SREBP, cuja forma ativa estimula regiões regulatórias do gene que codifica FAS (Swinnen *et al.*, 1997; Swinnen *et al.*, 2000; Heemers *et al.*, 2001). Além de FAS, testosterona causa um aumento coordenado da expressão de outros genes lipogênicos, como aqueles que codificam a acetil-CoA carboxilase, também envolvida na síntese de ácidos graxos, HMG-CoA-redutase e farnesil difosfato sintetase, que participam da síntese do colesterol (Heemers *et al.*, 2003).

A presença de receptores de andrógeno em melanomas ou linhagens celulares derivadas destes tumores ainda é controversa. Em amostras de tecidos, Kokoschka *et al.* (1982) compararam melanoma, nevo benigno pigmentado e pele normal com relação a receptores de estrógeno (RE) e andrógeno, mostrando expressão semelhante de RA entre os melanomas e a pele normal e expressão aumentada de RE nos melanomas, também em comparação com a pele normal. DiSorbo (1986) não encontrou positividade para RA em linhagem celular de melanoma humano (NEL-M1), ao passo que Morvillo *et al.* (2002) descreveram, em linhagens celulares de melanoma maligno, núcleos fortemente corados para RA, através de imunohistoquímica.

2.4. Inibidores específicos de FAS

2.4.1. Cerulenina

A cerulenina ([2R, 3S] -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida) é um produto natural do fungo *cefalospório caeruleus* e foi descoberta por Hata *et al.* (1960a, b) por suas propriedades antifúngicas. Somente em 1972, os grupos de Nomura & Vance demonstraram seu efeito como inibidor específico da síntese de ácidos graxos (Omura, 1976; Pizer *et al.*, 1996b). Esta droga inibe de forma irreversível a atividade da enzima FAS através de ligação covalente ao sítio ativo β -cetoacil sintase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda *et al.*, 2000). Entretanto, a instabilidade da molécula de cerulenina em experimentos animais limita sua utilização como agente anti-lipogênico (Omura, 1976).

2.4.2. C75

C75 é um análogo sintético da cerulenina, formado por uma cadeia de 7 carbonos (α -metileno- γ -butirolactona) e que possui os mesmos efeitos inibitórios sobre a atividade de FAS com a vantagem de ser mais estável e, portanto, ter melhor efeito “in vivo” (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

Loftus *et al.* (2000) demonstraram que o tratamento sistêmico, via intraperitoneal, de camundongos C57BL/60laHsd-lep^{ob} e BALB/c com cerulenina e C75 provoca redução da quantidade de alimento ingerida e significativa perda de peso, sendo necessária uma única dose de C75 para que a quantidade de alimento ingerido pelos animais diminua mais do que 90% nas primeiras 24 horas. Este trabalho sugere que a atividade de FAS seja importante para a regulação da quantidade de alimento ingerido pelos animais, podendo representar um alvo terapêutico para o tratamento da obesidade.

Tanto a cerulenina como o C75 produzem significativa inibição da progressão do ciclo celular, bloqueando a passagem da fase G0/G1 para a fase S em linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas humanas (Pizer *et al.*, 1996; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; Kuhajda, 2000; Li *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003). A inibição da atividade de FAS causa ainda, em células malignas, um aumento na taxa de morte por apoptose (Li *et al.*, 2001). Menendez *et al.* (2004) demonstraram, num estudo com linhagens derivadas de câncer de mama e ovário, que a inibição de FAS com cerulenina ou C75 leva a uma diminuição da expressão da oncoproteína ErbB2. O tratamento com estes inibidores de FAS causa também a redução no tamanho de tumores em modelos xenográficos (Pizer *et al.*, 1998; Pizer *et al.* 2000). Nestes trabalhos, os autores injetaram células derivadas de câncer de ovário humano (OVCAR-3) no peritônio de camundongos *nude* e observaram tumores de tamanho menor nos animais tratados com cerulenina ou C75 (Pizer *et al.*, 1998). Os mesmos autores (Pizer *et al.*, 2000) relataram uma marcante redução da síntese de ácidos graxos e do tamanho dos tumores, além de aumento da taxa de apoptose em camundongos que receberam implantes subcutâneos de células derivadas de câncer de mama (MCF7), após tratamento com C75. Gabrielson *et al.* (2001) demonstraram efeito semelhante em modelo xenográfico de mesotelioma, com células H-Meso. Alli *et al.* (2005) demonstraram que camundongos transgênicos *neu-N* que super-expressam ErbB2 e desenvolvem câncer de mama espontaneamente, tiveram uma significativa diminuição no aparecimento dos tumores quando tratados com C75. Segundo estes autores, apenas 20% dos camundongos tratados desenvolveram carcinoma de mama, em comparação com 50% dos animais do grupo controle. Estes resultados sugerem um efeito quimiopreventivo da inibição farmacológica de FAS no câncer de mama.

2.4.3. Orlistat

A droga Orlistat (Xenical®), aprovada pela FDA para emagrecimento, é um derivado semi-sintético da lipstatina que inibe irreversivelmente as lipases gástricas e pancreáticas no interior do trato gastrintestinal (Guercioli *et al.*, 1997) e que atua também como um inibidor específico de um dos sítios catalíticos da FAS (tioesterase). A inibição de FAS com Orlistat tem propriedades anti-tumorais e anti-proliferativas em um modelo xenográfico de câncer de próstata e em linhagens tumorais derivadas de câncer de próstata e mama (Kridel *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 2004). O sítio tioesterase é um dos sete sítios catalíticos que compõem a enzima FAS, sendo responsável pela liberação das moléculas recém sintetizadas de palmitato. Menendez *et al.* (2004, 2005c) demonstraram que o tratamento das linhagens celulares derivadas de carcinoma de estômago (NCI-N87) e de mama (SK-Br3) com Orlistat causou, além da inibição da síntese de ácidos graxos, um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, evitando a entrada na fase S. Além do mais, o Orlistat inibiu intensamente a expressão de ErbB2 através da estimulação da proteína PEA-3, responsável pela sua transcrição, e aumentou os níveis de p27^{Kip1}, levando as células a apoptose.

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

2.5. Efeitos biológicos da inibição da expressão e atividade de FAS

Os mecanismos pelos quais a inibição de FAS leva a redução do crescimento celular e provoca apoptose não estão esclarecidos, embora algumas hipóteses tenham sido sugeridas. Recentemente, Bandyopadhyay *et al.* (2006) inibiram a expressão de FAS através de RNAi em células de câncer de mama e avaliaram seus efeitos usando “microrrays” de DNA. Segundo este trabalho, a inibição de FAS leva a um acúmulo de malonil-CoA que por sua vez inibe a enzima de membrana mitocondrial CPT-1, responsável pela transesterificação de acil-CoAs de cadeia longa em acil-carnitina, permitindo sua entrada na mitocôndria para oxidação dos ácidos graxos. Os autores observaram também um aumento do lipídio ceramida, que está relacionado a respostas apoptóticas celulares mediadas por indutores de apoptose, como FAS/FAS ligante, TNF- α (fator de necrose tumoral α), fatores de crescimento, hipóxia e danos ao DNA. Foi observado ainda que a inibição de FAS promove aumento na expressão de genes pró-apoptóticos como BNIP3, TRAIL (“tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand”) e DAPK2 (“death-associated protein kinase 2”).

Segundo Pizer *et al.* (1998), a inibição da síntese endógena de ácidos graxos não tem efeito direto no DNA ou na maquinaria da replicação e envolve provavelmente a função de p53, a qual foi posteriormente demonstrada como sendo regulada por perturbações na síntese de ácidos graxos (Li *et al.*, 2001). Entretanto, o efeito citotóxico decorrente do bloqueio de FAS pode ocorrer de maneira independente de p53 através da ativação direta de sinais apoptóticos, como a alta expressão de Bax, pois a inibição de FAS resulta na liberação do citocromo C e ativação de caspases (Heiligtag *et al.*, 2002).

2.6. ErbB2 e câncer

A família Erb de receptores transmembrânicos com atividade de tirosina-quinase é formada por quatro membros: EGFR (Her-1, ErbB1), ErbB2 (Her-2), ErbB3 (Her-3) e ErbB4 (Her-4) (Eccles, 2000, Klapper *et al.*, 2000). A ativação destes receptores resulta em fosforilação de resíduos específicos de tirosina na região citoplasmática, causando a estimulação de múltiplas vias de sinalização intracelular (O-Chaorenrat *et al.*, 2002). Seus ligantes são produtos de genes distintos e consistem em mais de 30 membros, dentre os quais o EGF (“epidermal growth factor”), TGF- α (“transforming growth factor – α ”), AR (anfiregulina), HB-EGF (ligante de heparina-EGF), BTC (betacelulina), ER (epiregulinas) e inúmeras variantes de HRG (heregulinas), produzidas por “splicing” alternativo. O receptor ErbB2 (Her-2) não tem ligantes específicos identificados até o momento (Magnifico *et al.*, 1998, Penuel *et al.*, 2001, O-Chaorenrat *et al.*, 2000), sendo parceiro para heterodimerização com todos os outros membros da família Erb (Holbro *et al.*, 2003). A expressão anormal dos ligantes da família ErbB tem sido implicada na formação de neoplasias humanas como o câncer de mama e ovário com recorrência precoce e pior prognóstico (Slamon *et al.*, 1987 e 1989). ErbB2 está também expresso em grandes quantidades em câncer de endométrio, pulmão, ovário, mama e boca (Slamon *et al.*, 1987; Tateichi *et al.*, 1990; Pastorino *et al.*, 1997; Yarden, 2001; Ross *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004). Como mencionado anteriormente, foi demonstrado experimentalmente que ErbB2 regula a expressão de FAS em células derivadas de glândula mamária e câncer de mama (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). FAS também regula a expressão e atividade de ErbB2 em linhagens celulares de câncer de ovário (Menendez *et al.*, 2004). A importância desta proteína em carcinomas de mama vem sendo demonstrada pela utilização terapêutica com sucesso de anticorpos específicos contra o seu ectodomínio (Herceptina®) como

quimioterápico isolado ou em combinação com o agente alquilante cisplatina (Pegram *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 2002; Mandelsohn & Baselga 2003).

O papel da proteína ErbB2 na patogênese dos melanomas ainda é incerto. Persons *et al.* (2000) relataram expressão aumentada de ErbB2 em apenas 1 dos 40 melanomas por eles avaliados e Fink-Puches *et al.* (2001) relataram não ter encontrado expressão de ErbB2 em 30 casos de melanoma. Em concordância com estes autores, Potti *et al.* (2003), avaliaram 202 amostras de melanoma e encontraram que 2 destes tecidos tinham expressão aumentada de ErbB2. Por outro lado, Eliopoulos *et al.* (2002) avaliaram 51 pacientes portadores de melanoma primário, com invasão maior do que 10mm (índice de Breslow), e observaram que 29% tinham expressão aumentada de ErbB2. Achados semelhantes foram descritos por Bodey *et al.* (1997), que relataram a expressão de ErbB2 em 40% dos melanomas malignos primários e 80% dos melanomas metastáticos por eles avaliados. Também é controversa a expressão de ErbB2 em linhagens celulares derivadas de melanoma. Por exemplo, Chenevix-Trench *et al.* (1990) demonstraram pouca produção de ErbB2 em 16 linhagens celulares de melanomas, ao passo que Rogcun *et al.* (1999) observaram alta expressão de ErbB2 em 5 das 8 linhagens celulares de melanoma por eles estudadas (BL, BE, FMS, FM-3D, FM-55). Nenhum trabalho até o momento avaliou concomitantemente a expressão de ErbB2 e FAS em melanomas ou linhagens celulares derivadas destas neoplasias.

2.7. p27^{kip1}

A fase G₁ é o intervalo no qual a célula responde a estímulos extracelulares que determinarão o início da replicação do DNA ou a saída do ciclo celular e entrada em estado de quiescência (fase G₀). p27^{kip1} é um polipeptídeo membro da família Cip/Kip de inibidores de quinases dependentes de ciclinas que inibem o ciclo celular na fase G₁ (Polyak *et al.*, 1994; Soos *et al.*, 1996; Sherr *et*

al., 1999), protegendo os tecidos da proliferação excessiva (Polyak *et al.*, 1994). Em células quiescentes, os níveis de p27^{kip1} são geralmente altos, entretanto, quando as células entram no ciclo celular as proteínas da família Cip/Kip são destruídas pelos proteossomos num processo dependente de Skp2, uma ligase da ubiquitina E3 que é responsável pela ubiquitinação de p27^{kip1} (Schrump *et al.*, 1996; Loda *et al.*, 1997). Correlações entre a quantidade da proteína p27^{kip1} e o prognóstico de neoplasias malignas humanas foram primeiramente observadas em câncer de colon, sendo a seguir também encontradas em tumores de mama, próstata, bexiga, pulmão, fígado, laringe, ovário e estômago, dentre outros (Lloyd *et al.*, 1999; Tsihlias *et al.*, 1999; Singerland & Pagano, 2000; Philipp-Staheli *et al.*, 2001). Em melanomas, uma positividade para p27^{kip1} menor do que 5% foi associada a altos níveis de recorrência (Florenes *et al.*, 1998). Os níveis de p27^{kip1} em melanomas metastáticos, em comparação com os tumores primários do mesmo paciente, foram descritos como drasticamente reduzidos (Florenes *et al.*, 1998; Heenen *et al.*, 2003). Recentemente, Ivan *et al.* (2004) avaliaram a expressão de p27^{kip1} em amostras de nevo, nevo displásico, melanoma e melanoma metastático e mostraram positividade de 88% nos nevos, 95% nos nevos displásicos, 50% nos melanomas e 13% nos casos de melanoma metastático. Alonso *et al.* (2004) demonstraram que a expressão de p27^{kip1} em amostras teciduais de melanoma *in situ* foi de 76%, ao passo que em melanomas invasivos foi de 45% e em melanomas metastáticos 37%, apontando p27^{kip1} como um fator prognóstico para esta neoplasia.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

3.1. Avaliar o efeito da inibição de FAS com Orlistat em melanomas experimentais intraperitoneais provocados pela injeção de células B16F10 em camundongos C57BL6.

3.2. Avaliar o efeito do tratamento com Orlistat sobre o número e tamanho das metástases espontâneas provocadas pela injeção intraperitoneal de células B16F10 em camundongos C57BL6.

3.3. Estudar as conseqüências da inibição da atividade de FAS com Orlistat sobre as taxas de proliferação e apoptose e produção das proteínas FAS, ErbB2, Skp2 e p27^{Kip1} pelas células B16F10.

3.4. Estudar a produção de FAS por linhagens celulares estabelecidas a partir das metástases espontâneas e compará-las com a de linhagens oriundas dos respectivos tumores primários.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

A linhagem B16F10 (ATCC), derivada de um melanoma de camundongo, foi gentilmente cedida pelo Prof. Sílvio S. Veiga (Departamento de Biologia Celular, UFPR). Estas células foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, E.U.A) suplementado com 10% de FBS (Cultilab, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen, E.U.A.) na diluição de 1:100 a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

As células foram cultivadas até atingirem uma confluência de 60 a 70%, quando o meio de cultura era removido, as células lavadas com 10 ml de PBS pH 7,4 e então incubadas a 37°C com 0,5 ml ou 2 ml de tripsina a 2%, para frascos de 25 cm² ou 75 cm², respectivamente. Após um período que variou de 1 a 5 minutos, as células ficavam separadas do assoalho do frasco de cultura (o que era determinado por observação em microscópio de contraste de fase), sendo então a ação da tripsina interrompida pela adição de 5 ml (frasco de 25 cm²) ou 10 ml (frasco de 75 cm²) de meio de cultura com 10% de FBS. A suspensão de células era transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning, E.U.A.) e estes centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante era removido e descartado e os “pellets” de células ressuspendidos em 5 ml de meio de cultura com 10% de FBS, as células contadas e re-plaqueadas em novos frascos de cultura. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Em vários experimentos apresentados nesta tese, as células B16F10 foram cultivadas na presença de 2% de FBS, fato que está indicado no texto ou nas legendas das respectivas figuras.

4.2. Preparo das soluções de Orlistat

Para a aplicação em camundongos, o composto ativo do Orlistat (Xenical[®], Roche, Suíça) foi extraído de acordo com Knowles *et al.* (2004), dissolvendo-se o conteúdo de uma cápsula em 1ml de etanol a 33% em PBS, seguido de agitação por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a solução foi centrifugada a 16.000xg por 5 minutos e o sobrenadante coletado e estocado a -80°C até o momento do uso. Para o uso em experimentos de cultura celular, o mesmo protocolo foi seguido, entretanto, etanol absoluto foi utilizado para dissolver o conteúdo das cápsulas do medicamento.

4.3. Modelo animal de metástase espontânea de melanoma

O modelo animal utilizado nesta tese para o estudo de metástases espontâneas de melanoma foi descrito pelo professor Sílvio S. Veiga (Departamento de Biologia Celular, UFPR) em sua tese de doutoramento realizada no instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, em São Paulo (Veiga, 1997). A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (n° 732-1, CEEA-IB-UNICAMP – anexo I).

Quarenta camundongos C57BL6, com cerca de 10 semanas de vida, foram obtidos junto ao CEMIB-UNICAMP e mantidos em gaiolas apropriadas, alimentados com ração comercial Labina (Purina, Brasil) e providos de água *ad libitum*. Os animais ficaram em sala climatizada, com controle automático de iluminação, alternando períodos claros e escuros a cada 12 horas. Em cada experimento, foram realizados implantes intraperitoneais de células B16F10 ($2,5 \times 10^5$) suspensas em PBS e em passagem baixa (T3 ou T4). Depois de 48 horas das inoculações, deu-se início ao tratamento com 60µl da solução de Orlistat (o que corresponde a 240mg/kg/dia – via i.p.) até o 13° dia. Os animais dos grupos controle receberam injeções somente do veículo (solução contendo

33% etanol em PBS). Aproximadamente no 14° dia após os implantes das células, todos os animais foram sacrificados pela inalação de CO₂ e imediatamente dissecados, sendo coletados e fixados em formol a 10% os seguintes tecidos: tumor primário intraperitoneal, fígado, rins, baço, pulmões, coração, timo, linfonodos mediastínicos metastáticos e cérebro. Foram também coletados e congelados a -80°C fragmentos dos tumores primários e dos fígados para a realização de cortes por congelação e extrações de RNA para estudos futuros. Os tecidos foram incluídos em parafina e os cortes histológicos obtidos (5µm) corados com HE.

4.4. Cultura celular a partir do modelo animal

Seis animais foram sacrificados depois de 14 dias da implantação das células B16F10 e dissecados, sendo pequenos fragmentos do tumor primário e das suas metástases nos linfonodos da cavidade torácica colocados em tubos de 15ml (Corning, E.U.A.) contendo meio RPMI 1640 sem FBS e mantidos em gelo. Imediatamente após a coleta, os tubos foram levados para o fluxo laminar, os fragmentos cortados em pedaços ainda menores, lavados várias vezes com grandes quantidades de meio de cultura e plaqueados em garrafas de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 com 10% de FBS e solução antibiótica e antimicótica. Após um período de 12 a 15 dias, os fragmentos de tecido foram removidos das garrafas, sendo as células aderidas ao fundo dos frascos tripsinizadas e transferidas para garrafas 75 cm². A seguir as células foram congeladas em nitrogênio líquido. Desta forma, foram estabelecidas 12 novas linhagens celulares, as quais foram denominadas C1L, C1T, C2L, C2T, C3L, C3T, C4L, C4T, C5L, C5T, C6L e C6T (a letra L identifica as linhagens derivada das metástases nos linfonodos do mediastino e a letra T corresponde às linhagens derivada dos tumores primários intraperitoneais).

4.5. Preparação dos extratos protéicos e reações de western blotting

Os "pellets" de células foram obtidos através da raspagem dos frascos de cultura com "cell scrapers" descartáveis (Costar, E.U.A.) quando estas estavam cerca de 70% confluentes. As proteínas foram extraídas em um tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton X-100, 20mM de Tris-HCl pH 8,0, 137mM de NaCl, 10% de glicerol, 2mM de EDTA, 1mM de NaF e 1mM de Na₃VO₄. Os inibidores de protease PMSF (1mM), leupeptina (1µg/ml), inibidor de tripsina STI ("soybean trypsin inhibitor") (10µg/ml) e aprotinina (1µg/ml) foram adicionados ao tampão de lise imediatamente antes do uso. Aproximadamente cem microlitros deste tampão foram colocados sobre os "pellets" celulares (o volume foi ajustado de acordo com o tamanho dos "pellets" obtidos), os quais foram dissociados por pipetagem e mantidos no gelo por 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Depois deste período foi realizada centrifugação a 12.000xg por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados, sendo alíquotas de 5µl de cada extrato protéico separadas para espectrofotometria. Todos os extratos protéicos foram imediatamente congelados em gelo seco e transferidos para freezer -80°C, onde foram mantidos até o momento do uso. A concentração de proteína total dos extratos protéicos foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se o reagente de Bradford (Sigma, E.U.A.) e um espectrofotômetro Spectronic Genesys 2, ajustado para 595nm. Quantidades iguais de proteínas de cada extrato celular foram misturadas com um tampão de amostra redutor concentrado quatro vezes (8% de SDS, 0,25M de Tris-HCl pH 6,8, 30% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol), contendo 20% do volume total de DL-Ditiotreitol (DTT, Sigma), fervidas por 5 minutos e separadas eletroforéticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 8% ou 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Schuell, E.U.A.) e coradas com "Ponceau S" (Sigma, E.U.A.) para verificar a eficácia da transferência. Após bloqueio por 16h a 4°C em solução a 5% de leite

em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20mM de Tris-HCl pH 7,6, 150mM de NaCl e 1% de Tween 20 (TBST), as membranas foram incubadas com anticorpos primários anti-FAS (1:3.000, Transduction Laboratories, E.U.A), anti-p27 (1:1.000, Transduction Laboratories, E.U.A), anti-Skp2 (Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.), anti-c-erb-B2 (1:20.000, Dako, Denmark) ou anti- β -actina (1:40.000, clone AC-15, Sigma, E.U.A). Os anticorpos contra a proteína do citoesqueleto β -actina foram usados como controle da quantidade da proteína aplicada em cada canaleta. Depois de lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, as reações foram reveladas através de quimioluminescência utilizando-se o kit de detecção ECL (Western Blotting Analysis System, Amersham Pharmacia Biotech, E.U.A.) e expostas a filmes ultra-sensíveis (Hyperfilm Ultra Detection, Amersham Pharmacia Biotech, E.U.A.).

4.6. Coloração Oil Red “O” para lipídios

Os fragmentos congelados de tumor primário e de fígado foram cortados em criostato (Leica Microsystem, Alemanha) na espessura de 5 μ m, fixados em solução contendo 40% de formol e 10% de CaCl₂ por 1 hora e secos a temperatura ambiente (Theory and Practice of Histological Techniques, third edition, pág 218). Os cortes foram a seguir corados com solução de Oil Red “O” a 0,5% em propilenoglicol por 16 horas e contra-corados com hematoxilina de Mayer por 2 minutos, sendo montados com gelatina de glicerina (Laboratory Methods in Histotechnology, 1992, AFIP).

4.7. Estudo do efeito do Orlistat sobre o crescimento e morfologia das células B16F10

A linhagem B16F10-C5T (derivada de um tumor primário) foi plaqueada ($3,5 \times 10^5$ células) em 10 frascos de 75 cm^2 (Nunc, Dinamarca) com 10ml de meio RPMI 1640 (Invitrogen, USA) suplementado de 2% de FBS e Orlistat ou etanol como controle. As células foram tratadas com 100, 250, 500 ou $750 \mu\text{M}$ de Orlistat, sendo nos controles utilizado um volume de etanol absoluto equivalente ao da concentração de $750 \mu\text{M}$. Após 48 horas, os meios de cultura foram trocados e ao final de 72 horas as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante descartado e os “pellets” ressuspensos em 5ml de meio RPMI 2% FBS. As células foram contadas em uma câmara de Neubauer e todos os “pellets” normalizados pelo número total de células coletadas das garrafas tratadas com $500 \mu\text{M}$ de Orlistat, sendo a seguir congelados a -80°C até o momento do uso. Para avaliação do efeito do tratamento com Orlistat sobre a morfologia das células B16F10, foram plaqueadas $3,2 \times 10^3$ células em cada poço de lâminas para cultura celular de 8 poços (Labtek, Nunc, Dinamarca). O tratamento com 100, 250, 500 ou $750 \mu\text{M}$ de Orlistat ou etanol absoluto iniciou-se 24 horas após o plaqueamento, sendo o meio trocado após 48 horas e ao final de 72 horas as células foram fixadas com paraformaldeído a 3,7% por 15 minutos e lavadas 3 vezes com PBS durante 10 minutos. Finalmente, as células foram coradas com HE.

4.8. Extrações de melanina das células B16F10

Para a extração de melanina dos “pellets” de células B16F10, estes foram descongelados em gelo e ressuspensos em 1ml de PBS, sendo a suspensão homogeneizada em vortex, transferida para tubos de 1,5ml e centrifugada a $1.000 \times g$ por 5 minutos. Os sobrenadantes foram então removidos e

os “pellets” ressuspensos em 200µl de água destilada e 1ml de uma mistura éter/etanol (1:1). Depois de 15 minutos à temperatura ambiente, uma segunda centrifugação a 3.000xg por 5 minutos foi realizada e os sobrenadantes descartados, sendo os “pellets” solubilizados em 1ml NaOH 1M em 10% DMSO por 30 minutos em banho de água a 80°C. As soluções obtidas foram transferidas para cuvetas de quartzo e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 470nm (Ando, H. *et al.* 1999).

4.9. Experimentos para o estudo do ciclo celular e verificação das taxas de apoptose

Os experimentos de citometria de fluxo foram analisados no laboratório do Dr. Aníbal Vercesi, no Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em colaboração com a Dra. Karina G. Zecchin.

Para a análise da distribuição das células nas fases do ciclo celular, foram plaqueadas 6×10^4 células B16F10-C5T em frascos de 25cm² com meio RPMI 1640 suplementado com 2% FBS. Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi substituído por RPMI 1640 sem FBS e as células incubadas por mais 24 horas, quando então se iniciou o tratamento com Orlistat, novamente em meio contendo 2% de FBS. As células foram coletadas depois de 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas, fixadas com etanol a 70% gelado, colocadas a -20°C por 12 horas, lavadas em PBS gelado e tratadas com 10µg/ml de RNase durante 1 hora a 37°C. Após incubação com 50µg/ml de iodeto de propídeo a 4°C, a distribuição das células no ciclo celular foi analisada utilizando-se o software CellQuest (Becton Dickinson) em um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipado com laser de argônio. Dez mil eventos foram analisados para cada amostra.

Para os ensaios de apoptose foram plaqueadas $1,9 \times 10^5$ células B16F10-C5T em frascos de 75cm² e após 24 horas adicionado Orlistat a 250 ou

500 μ M e etanol como controle, por períodos de 10 e 20 horas. As células foram então tripsinizadas, lavadas em PBS e ressuspensas em um tampão de ligação contendo Anexina V-FITC (1:500). O índice de apoptose foi quantificado através de citômetro de fluxo, correspondendo ao número de células positivas para Anexina V-FITC. Dez mil eventos foram analisados para cada amostra.

4.10. Análise estatística

Para a comparação entre o número de metástases presentes nos animais controle e tratados com Orlistat foi utilizado o teste *t* de Student não pareado, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Padronização do modelo animal de metástases espontâneas de melanoma

Os animais não apresentaram alterações físicas ou comportamentais durante os 10 primeiros dias após a inoculação das células B16F10 na cavidade peritoneal. Entretanto, depois deste período, foi possível observar um aumento volumétrico no abdômen e uma redução da atividade locomotora dos camundongos. Exteriorização do tumor através da membrana peritoneal foi eventualmente observada, formando nódulos subcutâneos arredondados não ulcerados. Ao redor do 13° e 14° dias, os animais ficaram com a mobilidade acentuadamente reduzida e apresentaram dificuldades respiratórias, possivelmente pela compressão do tumor em crescimento sobre diafragma. De maneira geral, os camundongos não sobreviveram mais do que 15 dias após a inoculação das células de melanoma na cavidade peritoneal. Decidimos, portanto, sacrificá-los entre o 13° ou 14° dia, dependendo do estado geral. As Figuras 1 A e B mostram um camundongo C57BL6 logo após o sacrifício, com a cavidade peritoneal exposta, na qual se nota a presença de massa tumoral de coloração enegrecida e consistência mole, relativamente bem delimitada e localizada, na maioria dos casos no lado do inóculo. A exteriorização do tumor primário pode ser observada na parte inferior esquerda do abdômen deste animal (Figuras 1 B e C). Os tumores primários ocuparam geralmente grande parte da cavidade peritoneal, espalhando-se por entre os órgãos abdominais (Figura 1 D). É interessante salientar que todos os animais inoculados desenvolveram o tumor primário, o qual produziu metástases na cavidade torácica em todos os casos. Na Figura 1 E pode-se observar o mesmo animal da Figura 1A com a cavidade torácica já aberta, mostrando nódulos de coloração negra adjacentes ao timo, que correspondem aos linfonodos mediastínicos invadidos pelas células do melanoma

intraperitoneal. Os linfonodos normais são pequenos e de coloração clara, sendo dificilmente detectados durante a dissecação. Foram encontrados entre 0 e 6 linfonodos mediastínicos metastáticos por animal, em nossos experimentos.

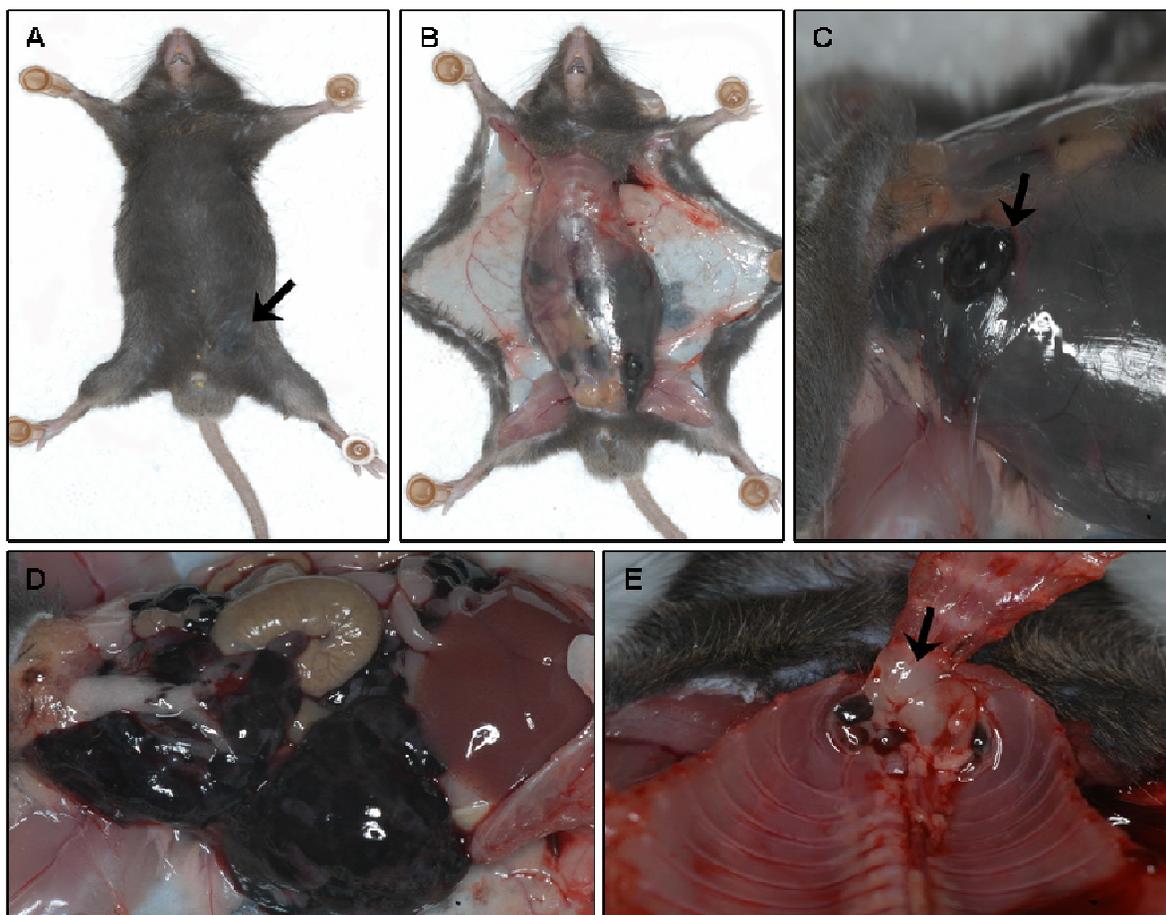


Figura 1. Camundongo C57BL6 representativo do modelo de metástases espontâneas de melanoma. Em **A** observa-se o animal com aumento de volume na região abdominal e discreto nódulo na região inferior esquerda (seta). Nas figuras **B** e **C** observamos a exteriorização do tumor primário da cavidade peritoneal. Na figura **D** observamos o tumor primário, relativamente delimitado e ocupando grande parte da cavidade peritoneal, com crescimento difuso em meio às vísceras abdominais. Em **E** pode-se observar a cavidade torácica deste mesmo camundongo, com os linfonodos mediastínicos metastáticos (pequenos nódulos de coloração negra). O tecido de coloração amarelo-esbranquiçada corresponde ao timo (seta), bastante evidente nos camundongos até a 12^o semana de vida.

5.2. Estabelecimento de linhagens celulares a partir do modelo animal

Foram coletados fragmentos do tumor primário e dos linfonodos mediastínicos metastáticos imediatamente após o sacrifício dos animais, os quais foram lavados com soro fisiológico em abundância e levados para o fluxo laminar, onde foram cortados em pequenos pedaços e colocados em frascos de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 com 10% de FBS e solução antibiótica e antimicótica. Na porção inferior da Figura 2 A podemos observar uma área escura que corresponde a um fragmento de tumor primário com células predominantemente arredondadas e de coloração negra se destacando, no terceiro dia após o plaqueamento. Na Figura 2 B, a imagem escura corresponde a um fragmento de linfonodo mediastínico metastático, ao redor do qual se pode notar dois tipos celulares distintos: células de cor negra e formato arredondado, que acabaram de se desprender do tecido, e células já aderidas com formato alongado (nono dia após o plaqueamento). Na Figura 2 C observamos a evolução da cultura celular, com células aderidas ao fundo do recipiente, momento em que os fragmentos de tecido foram removidos, as células tripsinizadas e transferidas para frascos maiores. A Figura 2 D mostra cultura celular com padrão monomórfico, que a seguir foi tripsinizada e estocada em nitrogênio líquido até o momento do uso.

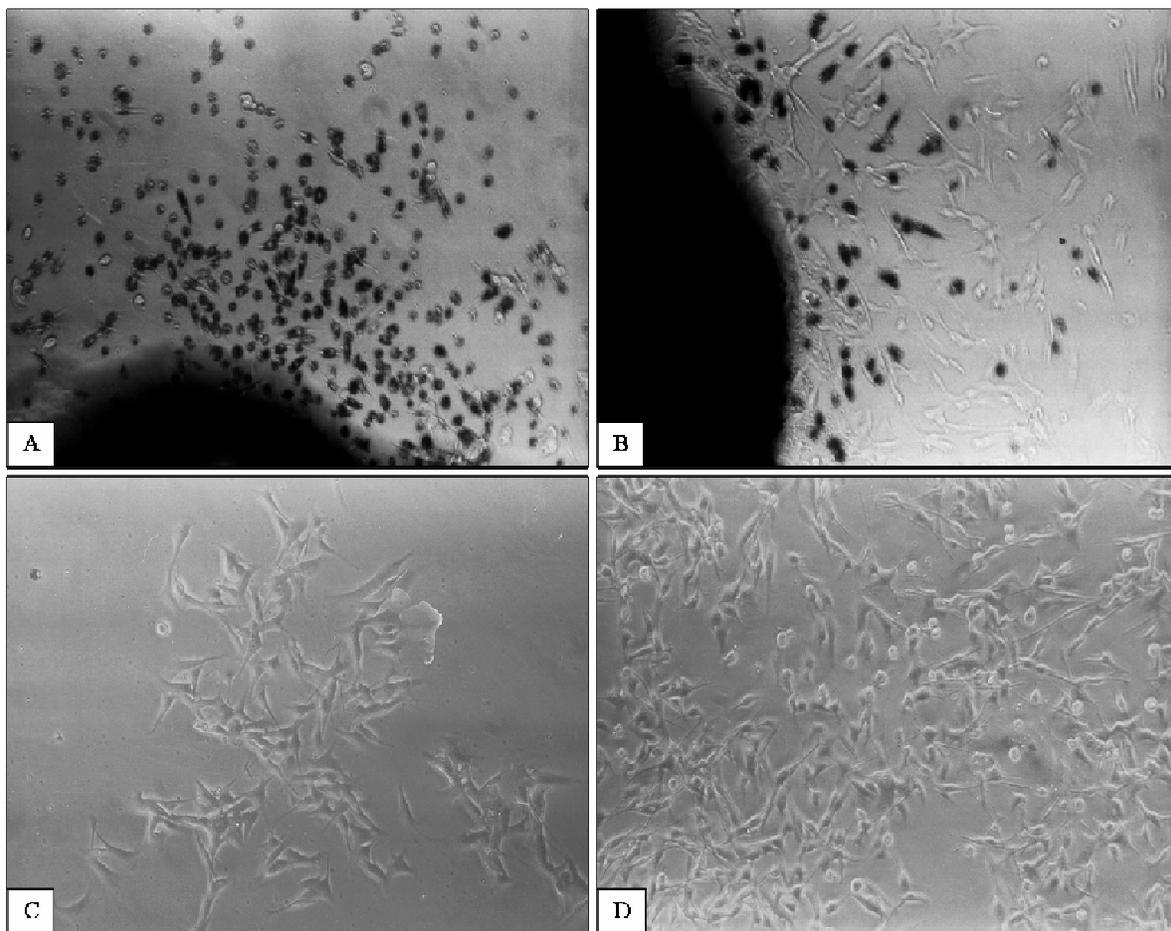


Figura 2. Fotografias representativas de diferentes etapas do estabelecimento das novas linhagens celulares de melanoma. Em **A** observa-se fragmento do tumor primário três dias após o plaqueamento, com células arredondadas e de coloração negra saindo do tecido tumoral. Em **B** pode-se notar um fragmento de linfonodo mediastínico metastático com células saindo do tecido e células já aderidas ao fundo do recipiente de cultura. Em **C** observamos uma ilha de células B16F10 derivada de um linfonodo metastático, com morfologia típica desta linhagem. A figura **D** mostra células já aderidas em estágio de subconfluência, no 10º dia após o plaqueamento, momento em que foram tripsinizadas e congeladas. Microscopia de contraste de fase. Aumento original de 200X.

5.3. Efeito do tratamento com Orlistat sobre a disseminação metastática do melanoma em modelo animal

Implantes intraperitoneais de células B16F10 foram realizados em 40 camundongos machos com 10 semanas de vida, distribuídos em 3 experimentos independentes. Os animais receberam o tratamento com Orlistat 48 horas após o implante das células de melanoma, pois nosso objetivo era analisar o efeito da droga em tumores já estabelecidos e não um efeito quimiopreventivo. O exame macroscópico evidenciou diferenças entre os tumores primários dos grupos tratado e controle. Os tumores do grupo tratado apresentaram-se mais fragmentados e dispersos dentro da cavidade peritoneal, sendo facilmente removidos pelo simples deslocamento dos órgãos para fora da cavidade peritoneal (Figuras 3 A, B e C). Já os tumores primários do grupo controle foram melhor delimitados e de consistência um pouco mais firme, estando normalmente confinados ao local onde as células B16F10 haviam sido implantadas. O aspecto sugestivo de fragmentação não foi tão evidente como no grupo tratado com Orlistat (Figuras 4 A, B e C). Os animais de ambos os grupos foram pesados diariamente, não havendo variações de peso até o 10º dia. A partir do 11º dia, quando já se podia notar um aumento de volume no abdômen, houve discreto ganho de peso, provavelmente devido à progressão do tumor (Figura 5). Um achado importante foi a inibição de aproximadamente 50% no número de metástases espontâneas para os linfonodos mediastínicos nos animais tratados com Orlistat, nos três experimentos independentes (Figuras 6 e 7 e Tabela 1). Os linfonodos, após as dissecações e contagens, foram fixados em formol a 10% e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura corados com HE foram utilizados para confirmação microscópica das metástases. Um dos animais do grupo controle apresentou áreas escurecidas nos pulmões (Figura 8), sugestivas de crescimento metastático, o que foi posteriormente confirmado através da análise microscópica (Figura 12). Este achado nos levou a conduzir

uma investigação mais detalhada de todos os pulmões dos animais do experimento 1, através de cortes histológicos semi-seriados, entretanto, nenhuma metástase além daquela já observada macroscopicamente foi detectada. O fígado de todos os animais do primeiro experimento foram também investigados através de cortes semi-seriados de 5µm corados com HE, sem evidências de metástases ou de alterações morfológicas nos hepatócitos. Entretanto, células de melanoma foram frequentemente observadas dentro dos vasos sanguíneos dos espaços-porta do fígado. Além do mais, os outros tecidos coletados também não apresentaram indícios microscópicos de metástases. Na Tabela 1 podemos observar um resumo dos achados macroscópicos dos 40 animais avaliados neste estudo.

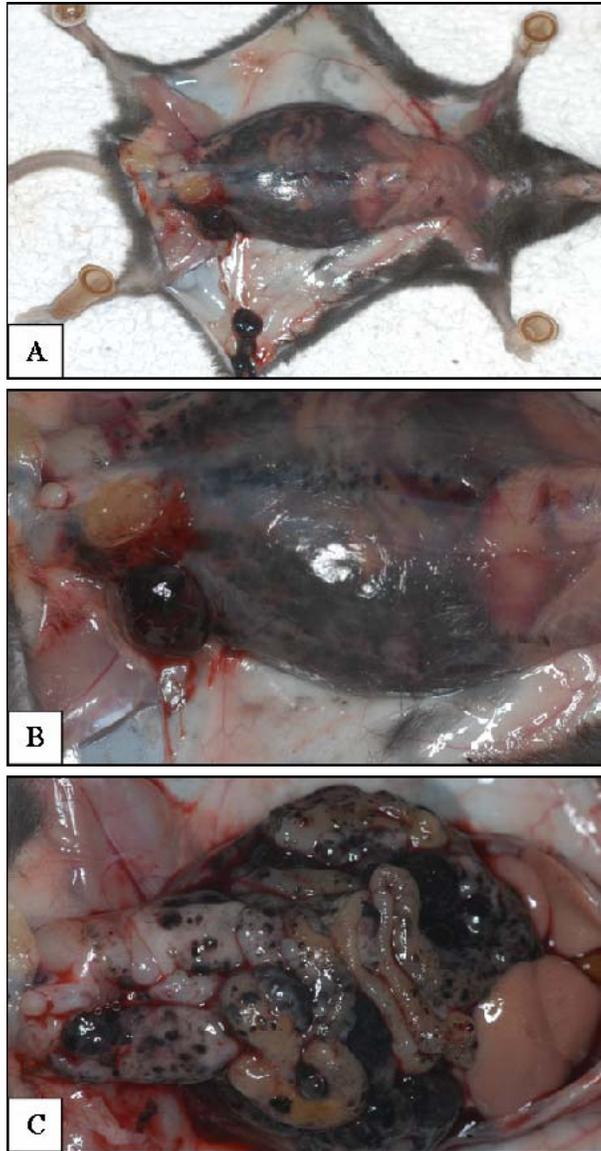


Figura 3. Fotografias representativas dos animais do grupo tratado com Orlistat. Em **A** e **B** observa-se o animal com a cavidade peritoneal ainda fechada e, na região inferior esquerda do abdômen, uma porção do peritônio perfurada pelo tumor (achado aleatório nos dois grupos). Na figura **C** podemos notar a fragmentação do tumor primário, com presença de pequenas “ilhas” tumorais espalhadas por toda cavidade peritoneal.

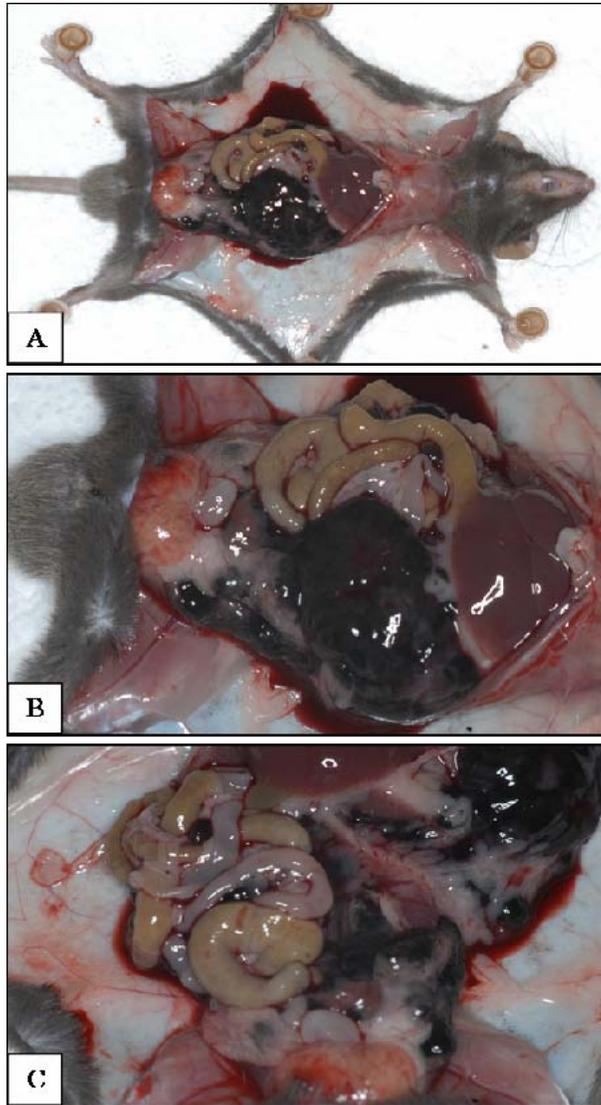
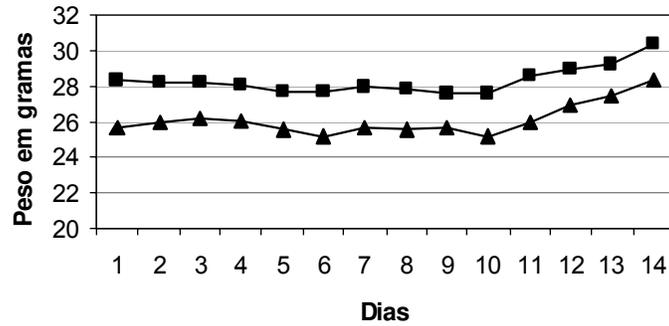
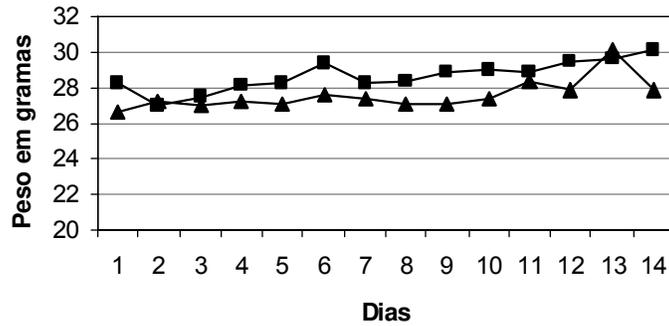


Figura 4. Fotografias representativas de animais do grupo controle, que receberam injeções de etanol. Em **A** observa-se animal com a cavidade abdominal já aberta, com uma massa tumoral de coloração negra e relativamente bem delimitada. Na figura **B** podemos observar a massa tumoral em maior aumento. A figura **C** mostra a mesma região após o deslocamento do tumor, que pôde ser removido em sua grande parte como uma massa única.

Experimento 1



Experimento 2



Experimento 3

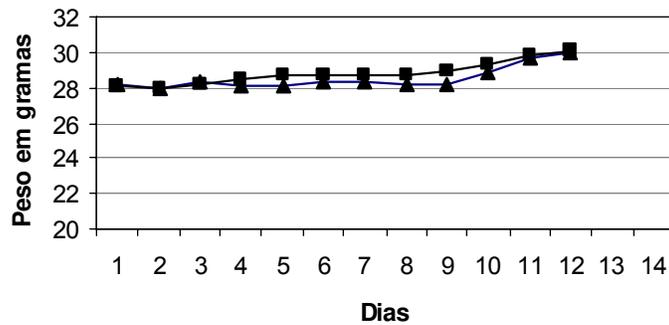


Figura 5. Evolução dos pesos dos camundongos tratados com Orlistat ou etanol durante os experimentos. Nota-se nos gráficos dos experimentos 1, 2 e 3 que os animais do grupo controle (■) e do grupo tratado (▲) não apresentaram variações significativas de peso. Um discreto aumento de peso foi observado a partir do 10º dia, provavelmente devido ao crescimento do tumor.

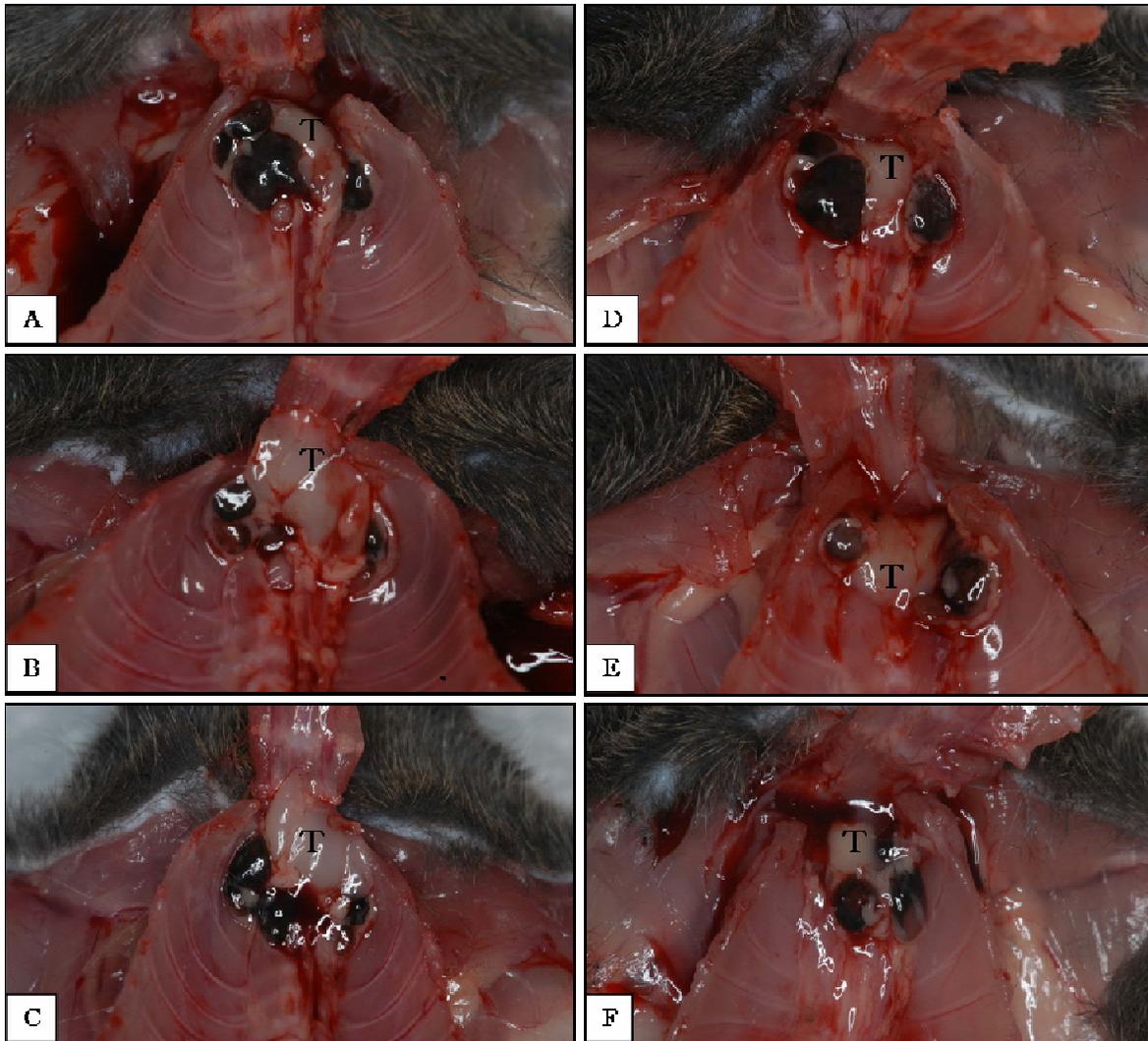


Figura 6. Fotografias representativas dos linfonodos metastáticos de camundongos dos grupos controle e tratado. Nota-se, nas figuras **A**, **B** e **C**, a cavidade torácica de três animais do grupo controle após a remoção do coração e dos pulmões e elevação do osso esterno. Os nódulos enegrecidos, lisos e esféricos adjacentes ao timo (T), representam as metástases. Em **D**, **E** e **F** pode-se observar o timo e os linfonodos metastáticos dos animais do grupo tratado com Orlistat. A diminuição do número de metástases devido ao tratamento com Orlistat pôde ser notada antes mesmo da dissecação e contagem dos linfonodos.

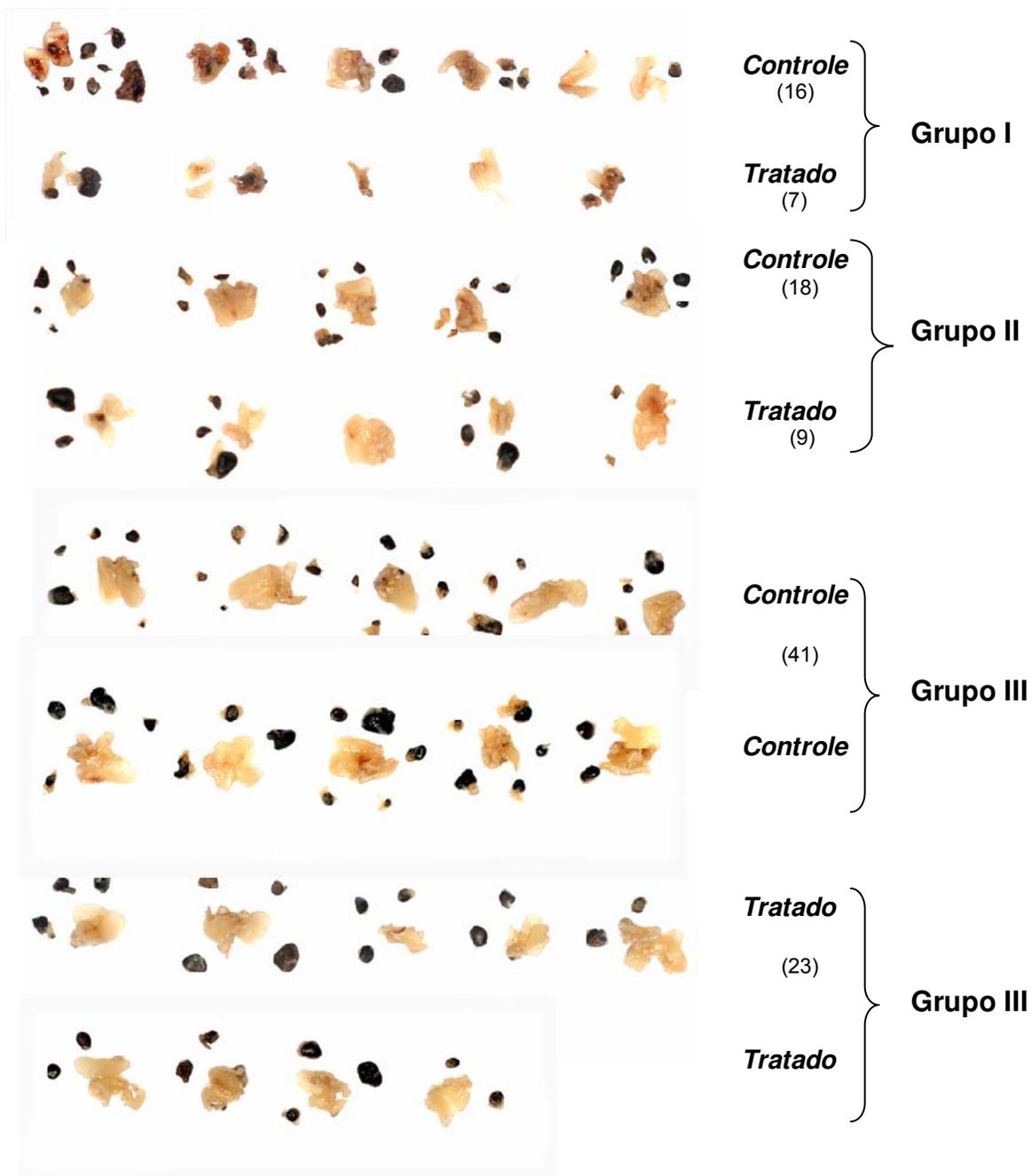


Figura 7. Linfonodos mediastínicos metastáticos e timo após a dissecação dos animais dos grupos tratados ou não com Orlistat. As pequenas estruturas de cor negra são os linfonodos mediastínicos metastáticos e o tecido amarelo-esbranquiçado representa o timo. Os grupos I, II e III identificam experimentos independentes. Houve redução de 56% no número de linfonodos metastáticos no primeiro, 50% no segundo e 44% no terceiro experimento, sendo a média de inibição de 50%.

Tabela 1. Grau de envolvimento dos linfonodos mediastínicos, presença de metástases à distância e de fragmentação do tumor primário após tratamento com Orlistat.

	Experimento	Número de animais	Linfonodos Metastáticos (média)	Metástases a distância	Fragmentação do tumor primário (%)
Controle	1	6	16 (2.66)	1	0 (0)
	2	5	18 (3.6)	0	0 (0)
	3	10	41 (4.1)	0	0 (0)
Total		21	75 (3.57)*	1 ^a	0 (0)
Orlistat	1	6	7 (1.16)	0	6 (100)
	2	4	9 (2.250)	0	3 ^b (75)
	3	9	23 (2.55)	0	9 (100)
Total		19	39 (2.05)*	0	18 (94.7)

Um animal do grupo tratado (primeiro experimento) não desenvolveu tumor primário detectável.

^aPara os pulmões

^bUm dos tumores primários deste grupo apresentou tamanho muito reduzido
 $p < 0,001$, teste t



Figura 8. Pulmões de um dos animais do grupo controle do primeiro experimento. Pode-se notar a presença de áreas escurecidas, as quais foram microscopicamente confirmadas como sendo metástases do melanoma intraperitoneal.

5.4. Análise microscópica

Os aspectos microscópicos dos tumores primários dos animais tratados ou não com Orlistat foram semelhantes, destacando-se as células tumorais com núcleos hipercromáticos, múltiplos nucléolos, pigmentação citoplasmática por melanina, figuras de mitose atípicas, extensas áreas de necrose e vasos sangüíneos neoformados. As Figuras 9 A-D mostram áreas representativas de tumor primário de um animal controle e as Figuras 10 A-D de animal tratado com Orlistat. Um achado que nos chamou a atenção foi a presença de células arredondadas e claras, com núcleos excêntricos, semelhantes à adipócitos, principalmente nos tumores primários do grupo controle (Figuras 9 C e 10 B e C). Todas as metástases para linfonodos mediastínicos foram microscopicamente confirmadas (Figura 11) e caracterizadas por invasão da região periférica dos linfonodos por células B16F10. A única metástase pulmonar encontrada em um dos animais do grupo controle (Figura 8) foi também microscopicamente confirmada. As figuras 12 A, B, C e D mostram que as células B16F10 invadiram o parênquima pulmonar deste animal, formando nódulos tumorais ou crescendo ao redor de vasos sangüíneos ou bronquíolos.

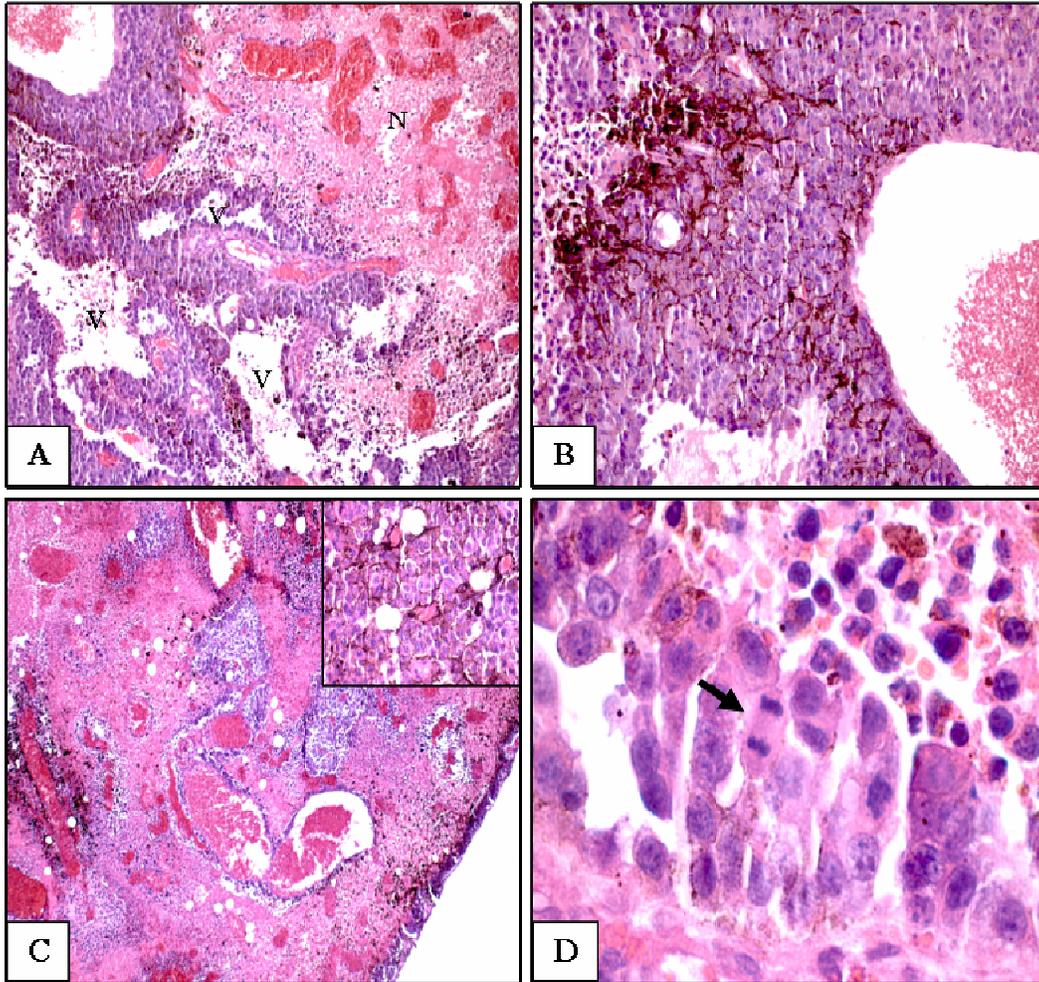


Figura 9. Fotomicrografias representativas do tumor primário de animais do grupo controle. Em **A** podemos ter uma visão geral do tumor, com áreas de necrose (**N**) e grande quantidade de vasos sanguíneos (**V**). Em **B** pode-se observar um lençol de melanócitos malignos com intensa pigmentação melânica. Células arredondadas, com citoplasma claro, semelhantes a adipócitos estão presentes em grande quantidade (**C**). Figuras de mitose também foram frequentemente encontradas, demonstrando a alta capacidade de proliferação deste tumor (**D**, seta). HE, aumentos originais A: 100X, B: 200X, C: 50X (destaque 400X) e D: 400X.

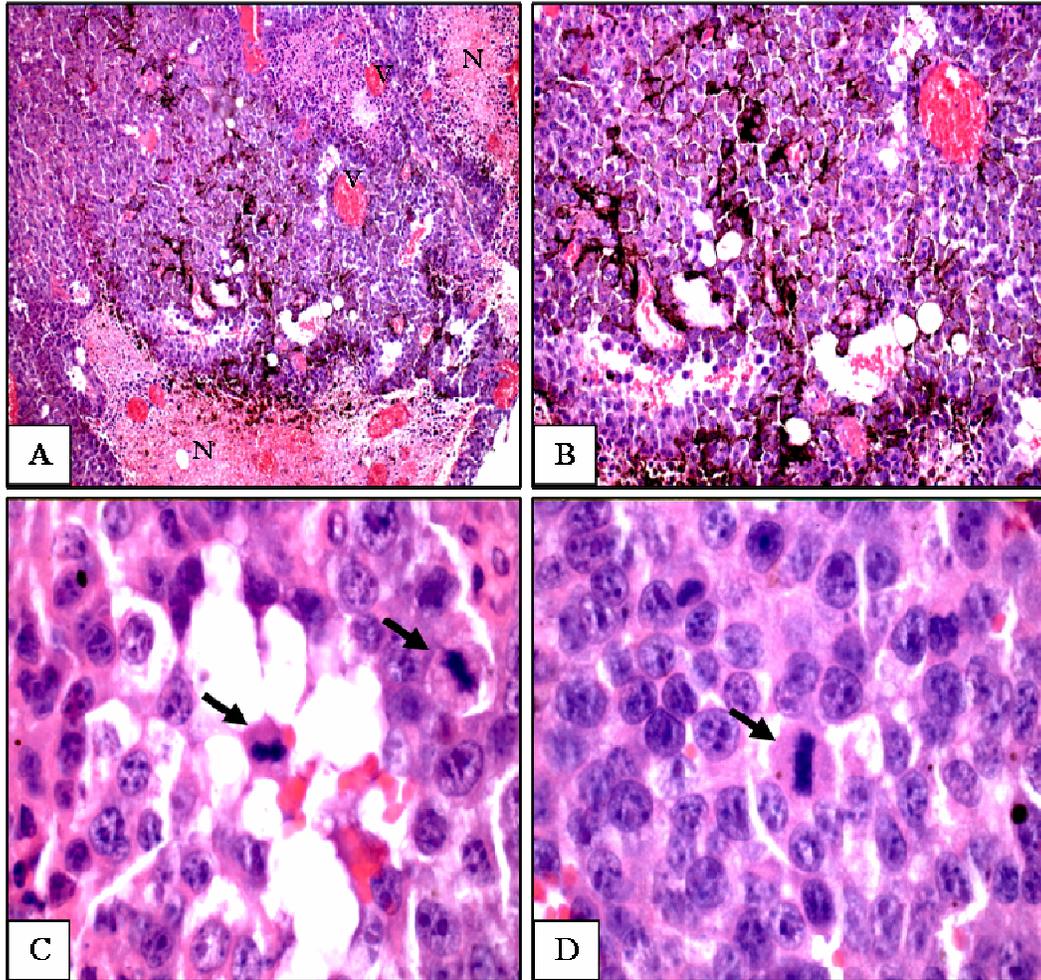


Figura 10. Fotomicrografias representativas do tumor primário dos animais do grupo tratado com Orlistat. Em **A** podemos notar um lençol de células tumorais com áreas de extensa necrose (**N**) e ricamente vascularizada (**V**). Em maior aumento observam-se as células tumorais pleomórficas ricas em melanina, assim como algumas células semelhantes a adipócitos (**B**). Áreas ricas em células claras, semelhantes a adipócitos, também caracterizam estes tumores, embora em menor quantidade que aqueles dos animais controle (**C**). Em **D** podem ser observados núcleos com vários nucléolos e uma figura de mitose (seta). Mitoses também podem ser observadas em **C** (setas). HE, aumentos originais A: 100X, B: 200X, C e D: 400X.

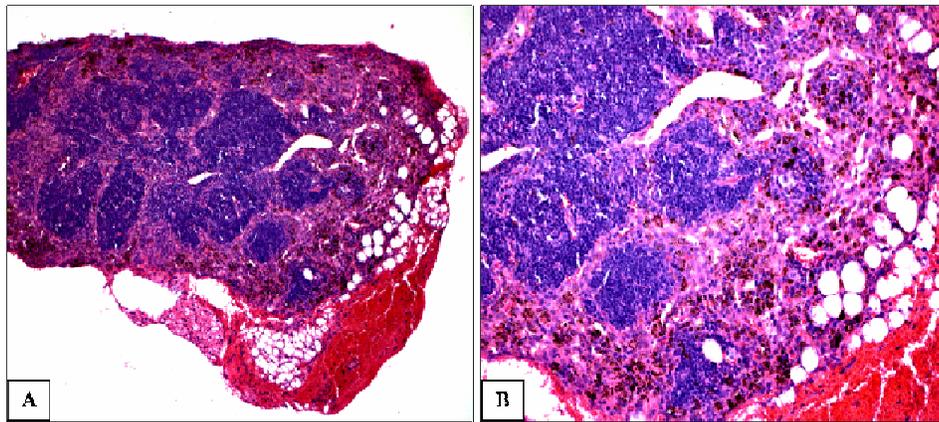


Figura 11. Fotomicrografias representativas de linfonodo metastático. Em **A** e **B** células tumorais são observadas na região mais periférica do linfonodo, infiltrando por entre os folículos linfóides. Note a grande quantidade de melanina presente nas células tumorais, além de adipócitos (**B**). HE, aumentos originais A: 100X e B: 200X.

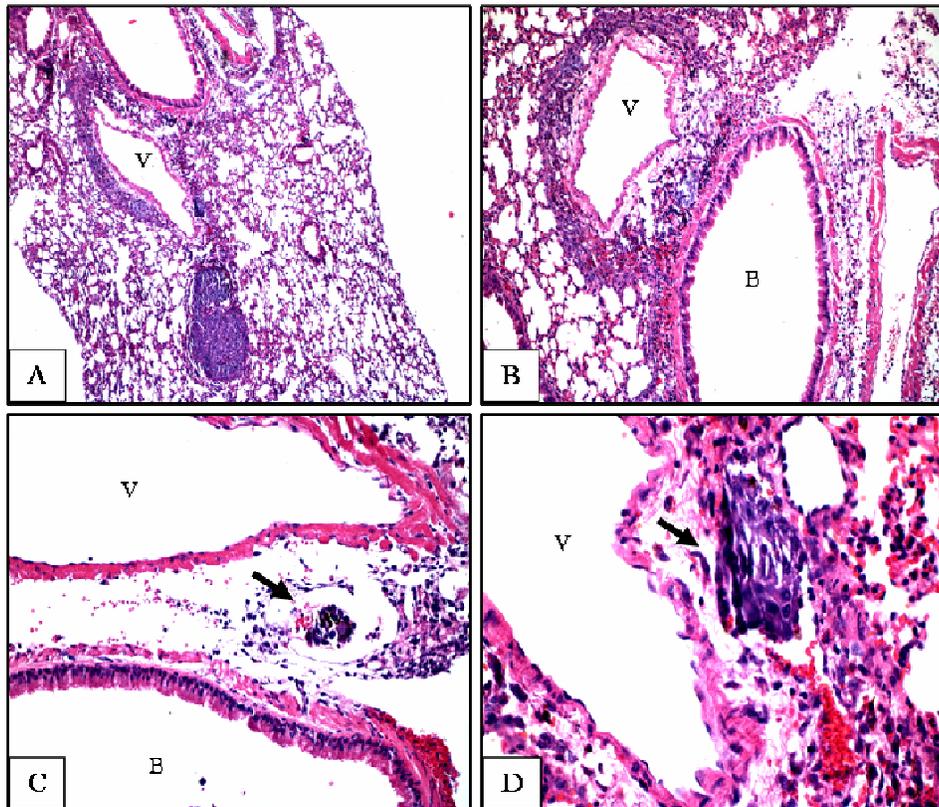


Figura 12. Aspectos microscópicos da metástase pulmonar mostrada na figura 8. Em **A** pode-se observar um nódulo bem delimitado de células tumorais no parênquima pulmonar, bem como o crescimento destas células ao redor de um vaso sanguíneo (**V**). A figura **B** mostra um outro vaso sanguíneo cercado por células de melanoma, ao lado de um bronquíolo (**B**). Em **C** e **D** observa-se, em maior aumento, pequenos grupos de células malignas infiltrando o parênquima pulmonar (setas). HE, aumentos originais: A: 50X, B: 100X, C: 200X e D: 400X.

5.5. Efeito da inibição de FAS no crescimento celular e melanogênese *in vitro*

O efeito do Orlistat sobre as células B16F10-C5T foi estudado através de contagens celulares, de análises morfológicas, da quantificação de melanina e de estudos de citometria de fluxo para avaliar o ciclo celular e o índice apoptótico. Inicialmente, foram plaqueadas $3,5 \times 10^5$ células B16F10-C5T em frascos de 75 cm² em meio suplementado com 2% FBS e Orlistat ou etanol absoluto em volume correspondente a maior concentração de Orlistat. A contagem das células presentes em cada frasco de cultura revelou que a droga retardou o crescimento, num efeito dependente da concentração (Figura 13). Nas concentrações mais elevadas (500 e 750µM), o Orlistat foi citotóxico para as células B16F10, visto que o número de células existentes no final do experimento foi menor que o plaqueado (Figura 13). Paralelamente, observamos os aspectos microscópicos destas células em lâminas para cultura celular e verificamos que aquelas tratadas com 250µM de Orlistat tiveram citoplasma reduzido e um aumento no comprimento dos prolongamentos celulares. Por outro lado, as células B16F10-C5T expostas a 500 e 750µM da droga tiveram prolongamentos citoplasmáticos ainda maiores ou aspecto fusiforme (Figura 14). Com o objetivo de verificar se o Orlistat inibe a atividade da enzima FAS nas células B16F10, realizamos inicialmente colorações com Oil Red “O”. Não foi possível, entretanto, observar acúmulos de lipídios no citoplasma destas células, provavelmente devido a sensibilidade do método. As células LNCaP, derivadas de um adenocarcinoma prostático, foram usadas como controle e exibiram grande quantidade de “gotículas” de lipídio coradas em vermelho. Tendo-se em vista que o palmitato é capaz de inibir a degradação proteossômica da enzima tirosinase (Ando *et al.*, 1999), responsável pela síntese de melanina, e nossas próprias observações de que células tratadas com Orlistat formavam “pellets” de coloração mais clara, decidimos realizar a extração de melanina das células B16F10-C5T tratadas ou não com Orlistat. De fato, pode-se observar na Figura 15 A que os “pellets” destas células têm originalmente uma cor

negra e que, na presença de Orlistat, se descolorem até se tornarem esbranquiçados a partir de 500 μ M da droga. Os “pellets” mostrados nesta figura são os mesmos utilizados para as contagens celulares do gráfico da Figura 13, sendo o número de células normalizado de acordo com a quantidade existente no “pellet” obtido com 500 μ M, pois com 750 μ M de Orlistat a quantidade de células foi muito pequena. A melanina foi então extraída e sua quantidade estimada em espectrofotômetro ajustado para 470nm. O gráfico da Figura 15 B confirma que a síntese de melanina foi inibida na presença de Orlistat, como sugerida pela observação visual dos “pellets” demonstrados na Figura 15 A.

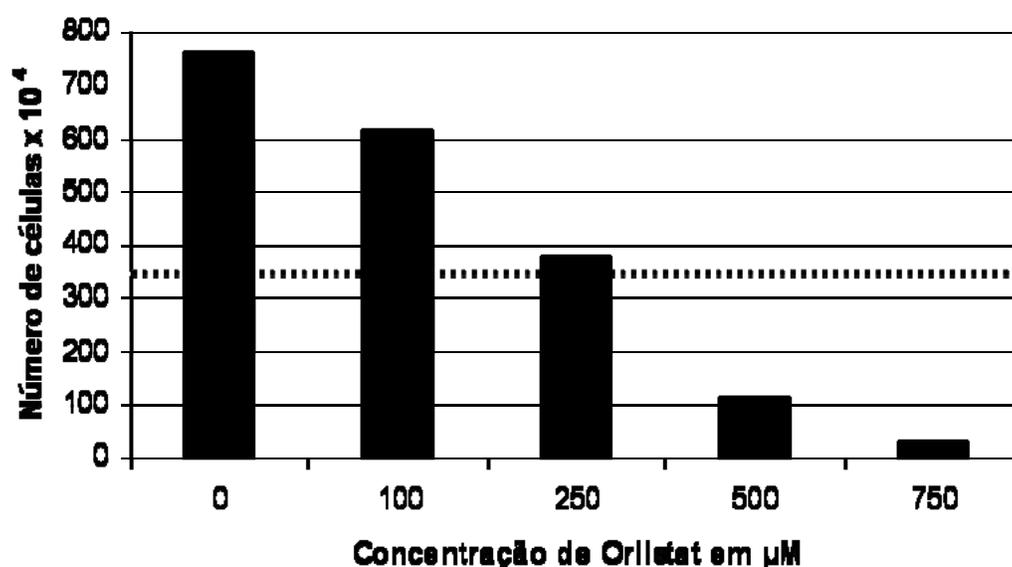


Figura 13. Representação gráfica do número de células existentes nos frascos de cultura após 72 horas de exposição ao Orlistat ou do solvente etanol como controle. Note que houve uma redução no crescimento das células B16F10-C5T nas concentrações de 100 e 250 μ M, enquanto que um efeito citotóxico ocorreu com 500 e 750 μ M, pois o número de células obtido foi menor que o existente no início do experimento (linha tracejada).

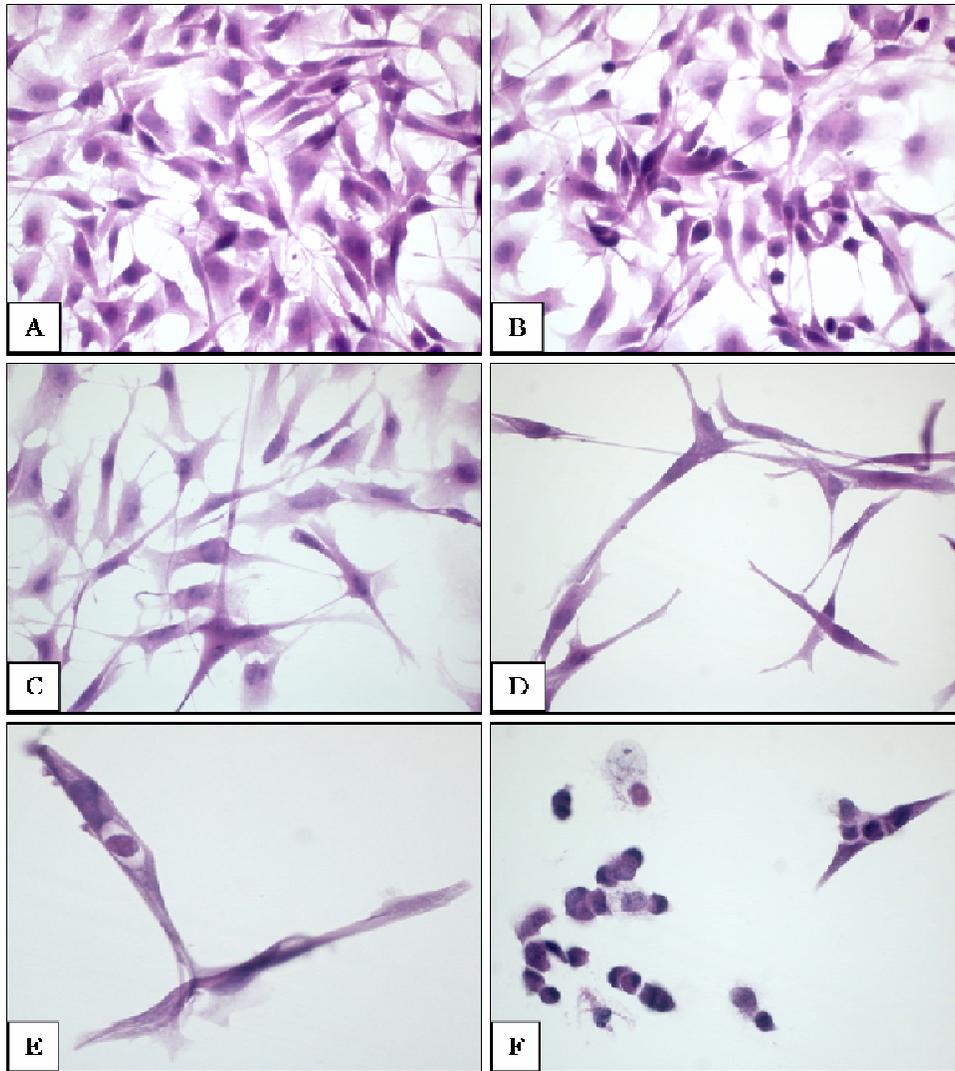
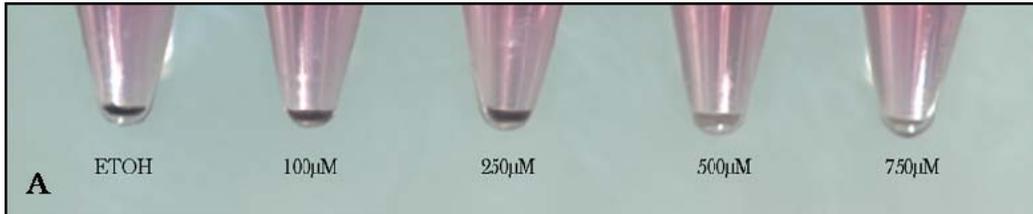
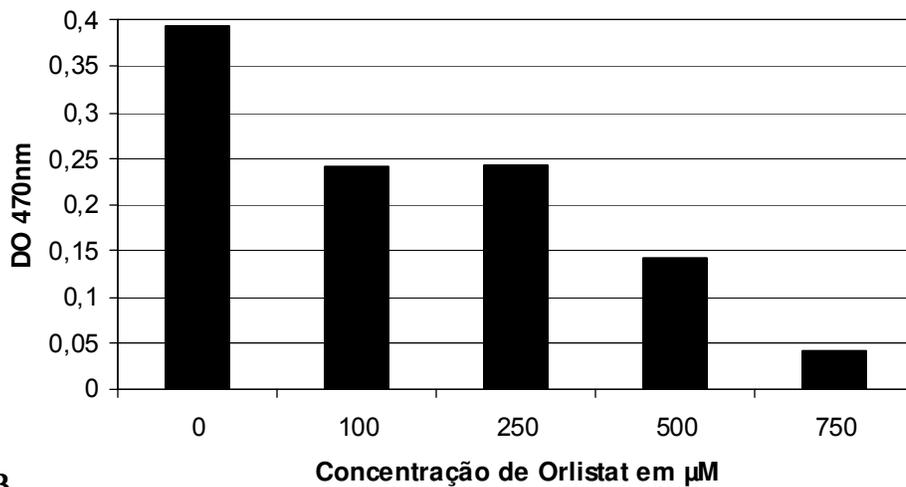


Figura 14. Alterações citológicas nas células B16F10-C5T observadas após o tratamento com diferentes concentrações de Orlistat por um período de 72 horas. **A:** células controle, tratadas somente com etanol, exibindo aspecto estrelado e prolongamentos citoplasmáticos relativamente curtos. As células incubadas na presença de 100 μ M da droga não exibiram alterações morfológicas (**B**), ao passo que aquelas tratadas com 250 μ M tiveram o citoplasma reduzido e prolongamentos citoplasmáticos mais longos (**C**). Altas concentrações de Orlistat acentuaram os prolongamentos celulares (500 μ M, **D**) e tornaram muitas células fusiformes (750 μ M, **E**). Morte celular por apoptose pôde ser observada, principalmente com 750 μ M de Orlistat (**F**). HE, aumento original: 400X.



A



B

Figura 15. A: “Pellets” de células B16F10-C5T tratadas com diferentes concentrações de Orlistat. Note que eles começam a ficar mais claros a partir de 250 μM da droga. O tubo da direita (750 μM) tem um “pellet” de menor tamanho devido ao efeito citotóxico do Orlistat, enquanto que todos os outros contém o mesmo número de células. O gráfico de barras (**B**) mostra a quantidade de melanina extraída destes “pellets”, estimada através de espectrofotometria.

5.6. Comprovação da inibição de FAS pelo Orlistat *in vivo*

A inibição da atividade lipogênica de FAS pelo tratamento com Orlistat foi verificada através de coloração de cortes por congelação com Oil Red “O”. Secções de 5µm de espessura, obtidas de amostras congeladas dos tumores primários e dos fígados de animais tratados ou não com Orlistat, foram realizadas em criostato e montadas em lâminas de vidro, fixadas por 1 hora em solução de formol/cálcio, coradas com solução a 0,5% de Oil Red “O” em propilenoglicol e contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Nos cortes provenientes dos tumores dos grupos controle, a marcação foi evidente na forma de gotículas de lipídios (provavelmente adipócitos) distribuídas por toda extensão dos tecidos, sendo mais fraca nas células neoplásicas. As células tumorais localizadas ao redor das gotículas de lipídeos foram intensamente coradas, provavelmente devido a difusão da gordura durante o processamento histológico (Figuras 16 A e B). Em contraste, nas amostras tumorais dos camundongos tratados com Orlistat não houve marcação positiva na forma de gotículas de lipídeos, mais sim positividade ao redor de espaços vazios semelhantes aqueles preenchidos por lipídios nos cortes controle (Figuras 16 C e D). Com o intuito de confirmar que a síntese endógena de ácidos graxos estava eficientemente inibida nos animais tratados, realizamos cortes por congelação e coloração por Oil Red “O” também do tecido hepático, nos quais foi possível observar grande quantidade de gotículas de lipídios no citoplasma dos hepatócitos dos animais controle (Figura 16 E). Por outro lado, o tecido hepático proveniente de camundongos tratados com Orlistat foi fracamente corado, exibindo uma quantidade muito menor de gotículas de lipídio (Figura 16 F). Estes achados sugerem que a atividade da enzima FAS foi efetivamente reduzida através das injeções intraperitoneais de Orlistat e que a diminuição no número de metástases espontâneas de melanoma foi dela decorrente.

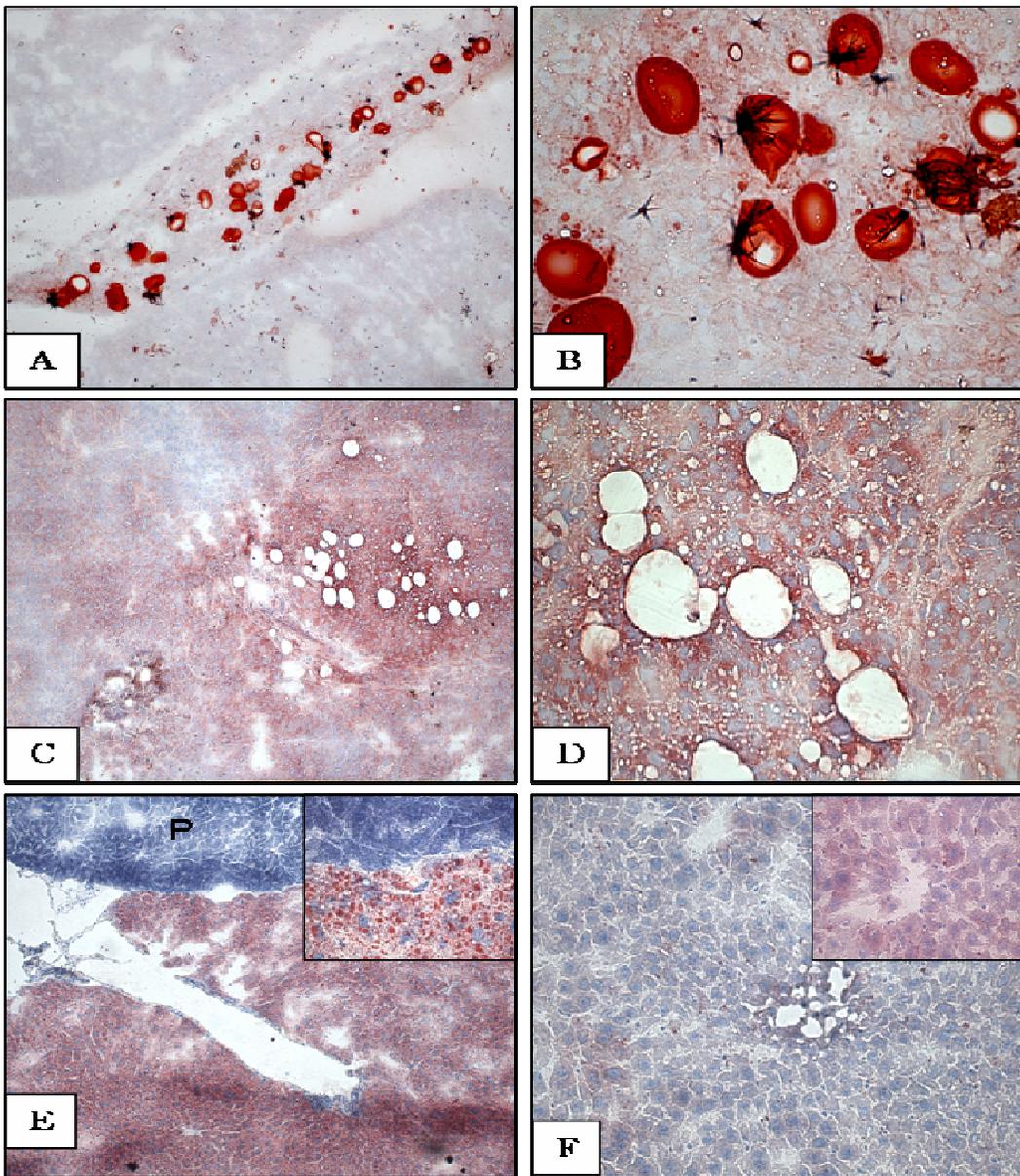


Figura 16. Coloração para lipídios com Oil Red “O” em cortes por congelação de tumores primários e de fígado de camundongos C57BL6 tratados ou não com Orlistat. Depósitos de gordura com formato arredondado e intensamente corados em vermelho foram encontrados dispersos por entre as células dos tumores primários dos animais que receberam apenas injeções de etanol (**A** e **B**). Nos tumores retirados de animais tratados com Orlistat foram observados espaços, provavelmente correspondentes aos depósitos de lipídios dos tumores do grupo controle, aparentemente vazios ou parcialmente preenchidos (**C** e **D**). As células tumorais ao redor destes espaços foram mais coradas pelo Oil Red “O”, tanto no grupo controle (**B**) como no tratado (**D**). Os hepatócitos dos camundongos controle foram intensamente corados, exibindo grande quantidade de pequenas gotículas de gordura dentro do citoplasma (**E**), os quais estavam presentes em quantidades significativamente menores no fígado de animais tratados com Orlistat (**F**). A especificidade da coloração pode ser observada pela completa ausência de marcação no tecido pancreático exócrino (**P**), observado na parte superior da figura **E**. Aumentos originais A e C: 100X; B e D: 400X; E: 100X, detalhe 400X; F: 200X, detalhe 400X.

5.7. Avaliação do efeito do Orlistat sobre o ciclo celular e o índice de apoptose das células B16F10

Para avaliarmos o efeito do Orlistat sobre o ciclo celular das células B16F10, estas foram semeadas (6×10^4 células em frascos de 25cm^2) em meio RPMI 1640 suplementado com 2% de FBS e sincronizadas por 24 horas. Após tratamentos por 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas, as células foram coletadas, fixadas em etanol a 70% gelado e guardadas a -20°C . Como ilustrado na figura 17, houve uma nítida inibição da progressão do ciclo celular, dependente da dose de Orlistat e caracterizada por um aumento da quantidade de células nas fases G0/G1. Em contrapartida, o número de células nas fases S e G2/M foi reduzido após a inibição de FAS (Figura 18). A maior inibição da progressão do ciclo celular ocorreu durante o tratamento com $500 \mu\text{M}$ de Orlistat por um período de 36 horas (Figura 18 e 19).

Para a verificação do efeito do Orlistat sobre o índice de apoptose das células B16F10, foram plaqueadas $1,9 \times 10^5$ células em frascos de 75cm^2 contendo meio suplementado com 2% de FBS mais 250 ou $500 \mu\text{M}$ de Orlistat por 20 horas. As células foram fixadas em etanol a 70% e incubadas com anexina V-FITC. A porcentagem de células apoptóticas, em comparação aos controles, aumentou 42,2% com $250 \mu\text{M}$ e 265% com $500 \mu\text{M}$ da droga (Figura 20). Estes resultados demonstram que a inibição da síntese endógena de ácidos graxos promove apoptose em células B16F10, à semelhança do que tem sido claramente demonstrado em várias outras linhagens tumorais (ver discussão).

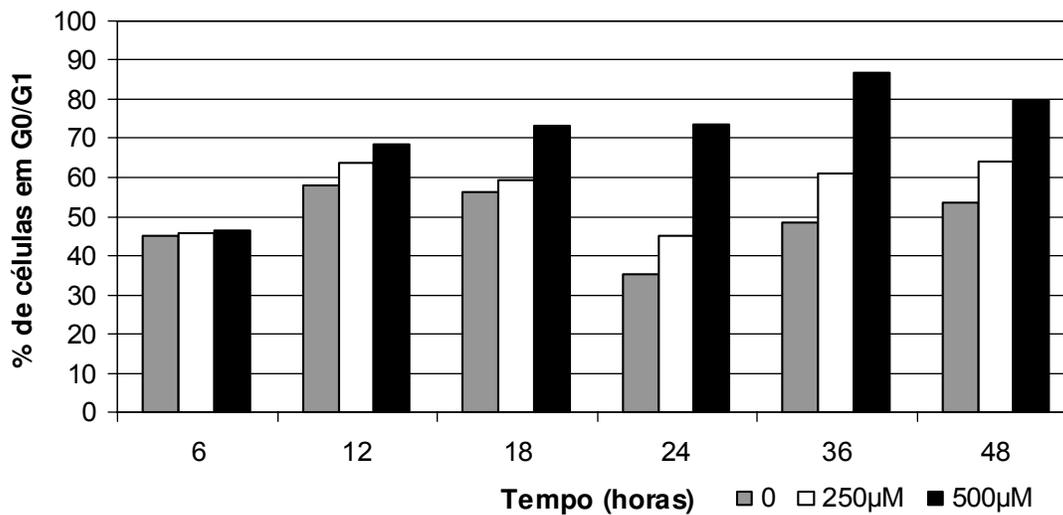


Figura 17. Análise, através de citometria de fluxo, da quantidade de células B16F10 nas fases G0/G1 do ciclo celular, após incubação na presença de 250 ou 500 μM de Orlistat. Pode-se notar que 6 horas após o início do tratamento existe uma porcentagem muito semelhante de células nas fases G0/G1, sendo que este número aumenta com o tempo de tratamento. O pico de inibição do ciclo celular ocorreu após 36 horas.

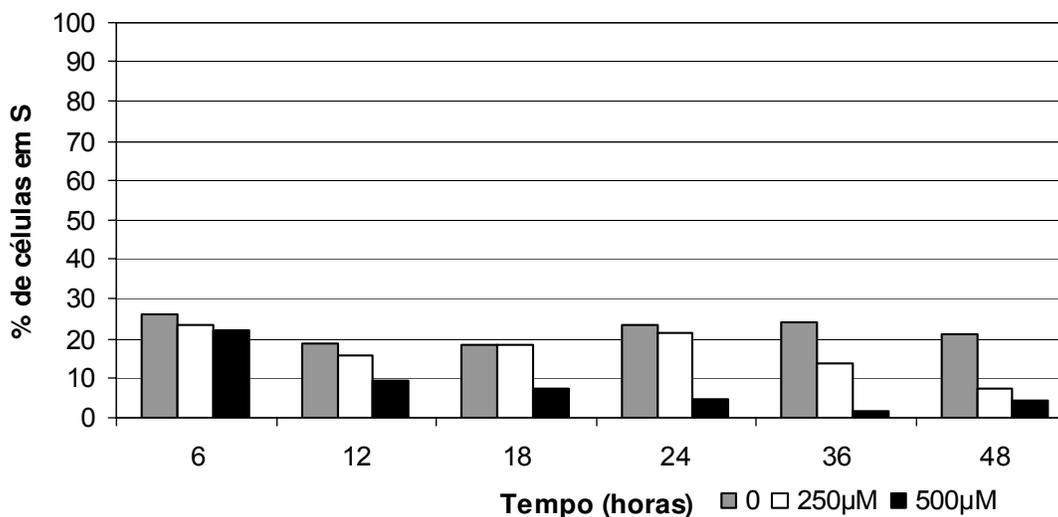


Figura 18. As mesmas células estudadas na figura anterior foram analisadas com relação as fases S e G2/M do ciclo celular. Podemos notar, neste gráfico, que houve uma diminuição da porcentagem de células nestas fases do ciclo, sendo a inibição máxima observada nas células tratadas com 500 μM de Orlistat após 36 horas.

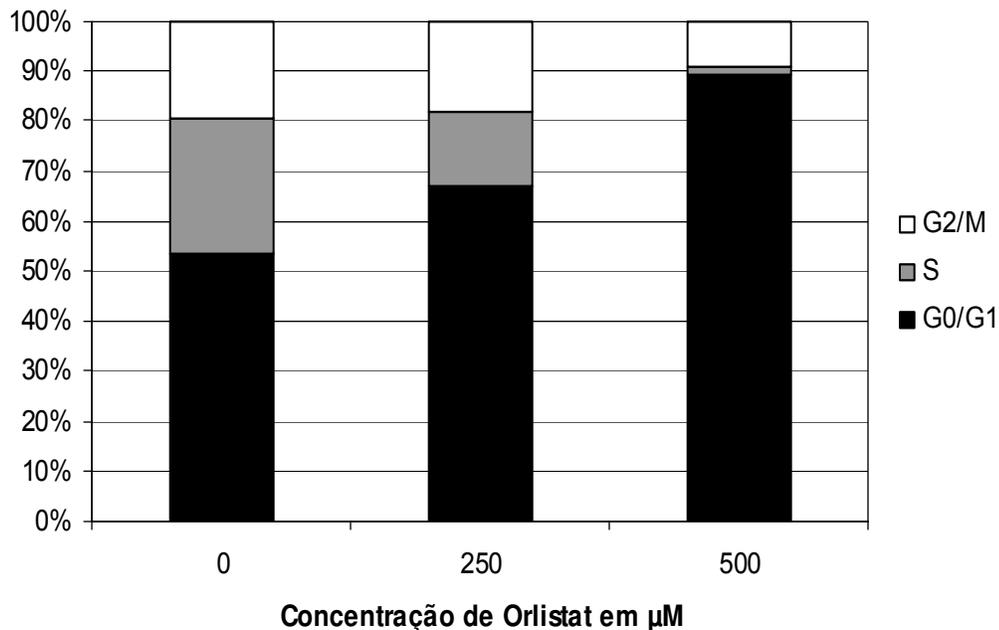


Figura 19. Este gráfico mostra a distribuição das células B16F10 nas fases do ciclo celular após tratamento com 250 ou 500µM de Orlistat por 36 horas. Note que houve um gradativo aumento das células nas fases G0/G1 concomitante com uma diminuição nas fases S e G2/M.

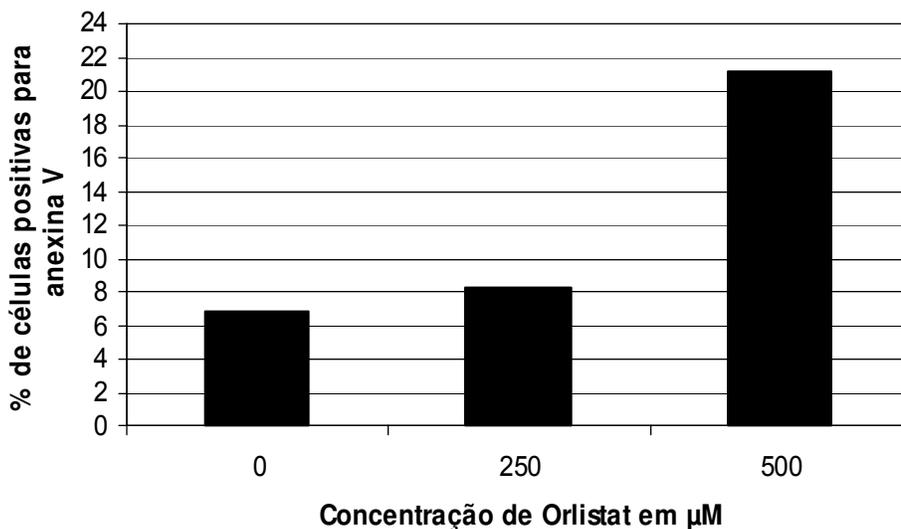


Figura 20. A porcentagem de células apoptóticas após o tratamento com Orlistat por um período de 20 horas foi avaliada pela marcação com Anexina-V FITC em citômetro de fluxo. Nota-se que há um aumento de 42,2% nas células tratadas com 250µM de Orlistat e de 265% nas células tratadas com 500µM da droga.

5.8. Expressão de FAS nas linhagens celulares isoladas a partir dos tumores primários e suas respectivas metástases nos linfonodos mediastínicos.

Três padrões de expressão de FAS foram observados nos pares de linhagens celulares derivadas dos tumores primários e suas metástases. Os pares C1L/C1T e C5L/C5T apresentaram quantidade de FAS mais baixa nos extratos protéicos provenientes da linhagem metastática, em comparação com a linhagem do tumor primário do mesmo animal (Figuras 21 A e B). Os pares C2L/C2T e C4L/C4T exibiram maior quantidade de FAS nos extratos provenientes das linhagens metastáticas, em relação às linhagens dos seus respectivos tumores primários (Figuras 21 C e D). Finalmente os pares C3L/C3T e C6L/C6T tiveram quantidade semelhante da proteína FAS (Figuras 21 E e F).

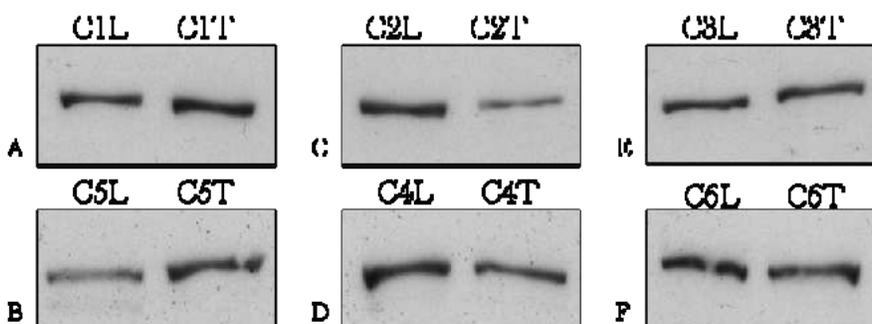


Figura 21. Comparação, através de reações de western blot, das quantidades da proteína FAS presentes nos extratos protéicos das linhagens celulares obtidas dos tumores primários e suas respectivas metástases mediastínicas. Em A e B observamos os pares C1L/C1T e C5L/C5T, que tiveram mais FAS nas células dos tumores primários. O contrário ocorreu nos pares C2L/C2T e C4L/C4T (C e D), que apresentaram bandas mais intensas de FAS nas linhagens derivadas dos linfonodos metastáticos. Os pares C3L/C3T e C6L/C6T mostraram bandas de FAS com intensidades muito semelhantes.

5.9. Efeito do tratamento com Orlistat sobre a produção de FAS, ErbB2, p27 e Skp2 pelas células B16F10

A adição de Orlistat na concentração de 100µM ao meio de cultura das células B16F10-C5T pelo período de 36 horas provocou um discreto aumento na quantidade da proteína FAS, em relação as células controle incubadas somente com etanol (Figuras 22 A e 23 A). Nas concentrações de 200 a 500µM houve uma redução progressiva nas intensidades das bandas de FAS (Figuras 22 A e 23 A). Com relação a oncoproteína ErbB2, observou-se redução da sua quantidade nos extratos protéicos preparados a partir de células tratadas com 100µM de Orlistat, sendo que as bandas mantiveram-se mais fracas que o controle até 200µM, aumentaram de intensidade em 300 e 400µM e diminuíram novamente com 500µM da droga (Figuras 22 B e 23 B). A falta de atividade da enzima FAS pode ser gerado como resposta um aumento na transcrição do gene que a codifica ou mesmo a sua estabilização à nível protéico, nas concentrações mais baixas de Orlistat. Por outro lado, isto pode ter causado uma redução na quantidade de ErbB2, pois há uma conexão direta entre estas duas proteínas em células derivadas de epitélio mamário (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Um nítido aumento da quantidade da proteína p27 (Figuras 22 C e 23 C) nos extratos protéicos de células tratadas com 400 e 500µM de Orlistat, associado a uma diminuição da intensidade das bandas de Skp2 (Figura 22 D e 23 D) sugere inibição da progressão do ciclo celular, fato já demonstrado nos experimentos de citometria de fluxo desta tese.

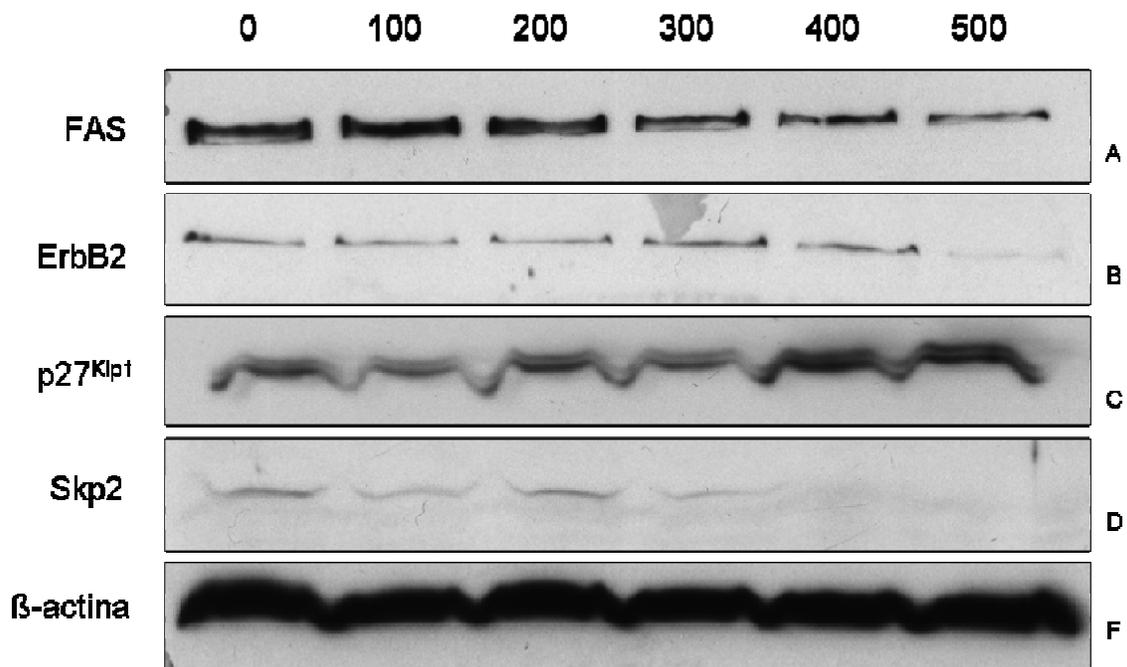


Figura 22. Experimentos de western blot representativos do efeito do tratamento com Orlistat sobre a quantidade das proteínas FAS, ErbB2, p27^{Kip1} e Skp2 nas células B16F10-C5T. Em **A** notamos um discreto aumento da banda de FAS nas células tratadas com 100μM de Orlistat e uma redução progressiva nas células tratadas com 200 a 500μM da droga. Em **B** observamos uma discreta redução na intensidade da banda de ErbB2 com 100 e 200μM de Orlistat, seguida de aumento em 300 e 400μM e acentuada redução na presença de 500μM da droga. Na figura **C** observamos um aumento da proteína p27^{Kip1} nas células tratadas com concentrações de 400 e 500μM de Orlistat e em **D** uma diminuição da quantidade da proteína Skp2, nas mesmas condições. Em **F** notamos que todas as canaletas receberam a mesma quantidade de proteína, através da detecção da proteína de citoesqueleto β-actina.

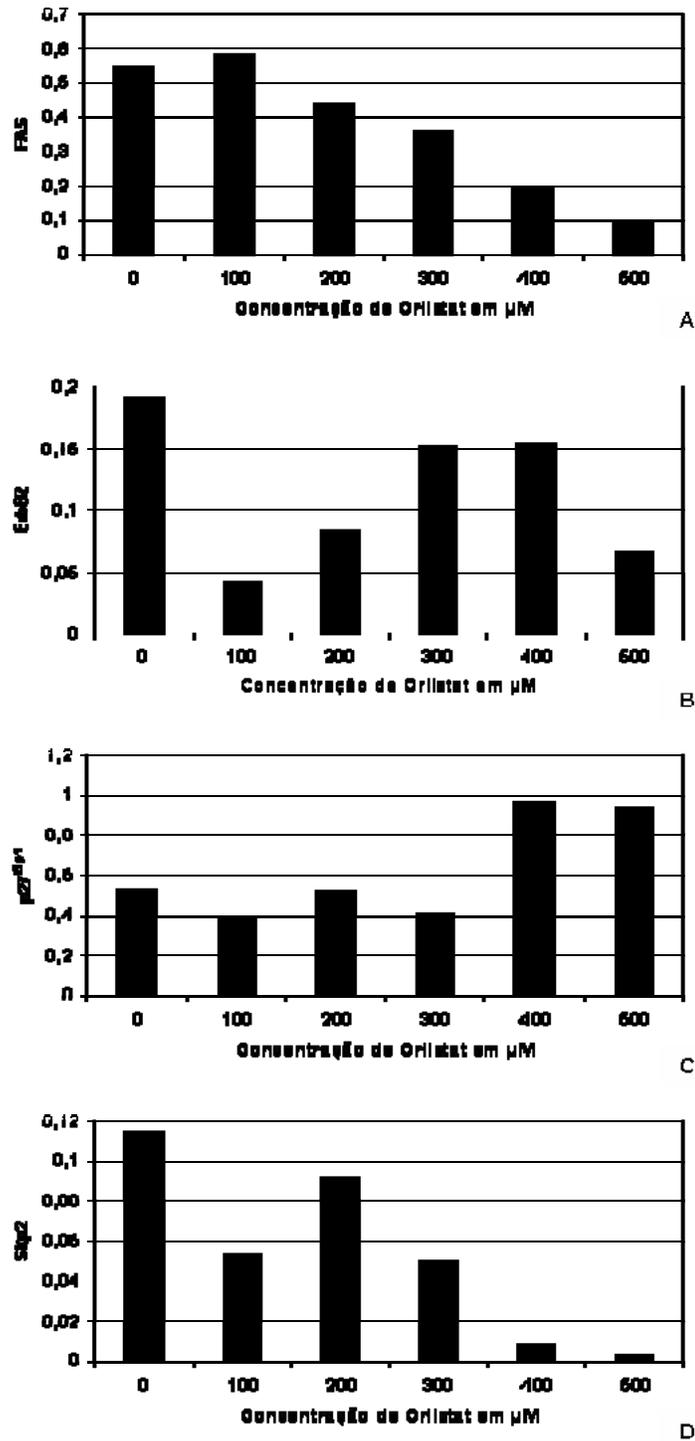


Figura 23. Análise densitométrica das bandas de FAS (A), ErbB2 (B), p27^{Kip1} (C) e Skp2 (D) a partir das reações de western blot mostradas na figura 22.

6. DISCUSSÃO

A FAS vem sendo apontada, na literatura científica recente, como um alvo atraente para a quimioterapia ou quimioprevenção de diversos tumores malignos, pois sua expressão é baixa ou mesmo ausente na maioria dos tecidos humanos adultos normais e está muito aumentada em diversos tipos de neoplasias malignas humanas (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). Além do mais, vários estudos têm demonstrado uma associação positiva entre a expressão de FAS e o comportamento agressivo de algumas destas doenças (Epstein *et al.* 1995, Alo *et al.* 1996, Gansler *et al.* 1997, Kuhajda 2000) e que inibidores específicos da sua atividade são capazes de bloquear o ciclo celular, diminuindo a proliferação e aumentando a taxa 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). Em tecidos provenientes de CECs bucais, a cerulenina é capaz de diminuir a síntese de ácidos graxos de forma mais eficiente do que nas amostras de mucosa oral morfológicamente normal (Guo *et al.*, 2003). Em melanomas, observou-se uma correlação positiva entre expressão de FAS e índice de Breslow, além de uma correlação inversa entre a presença de FAS e o tempo de sobrevida total (Innocenzi *et al.* 2003). A alta expressão de FAS nestes tumores cutâneos extremamente agressivos parece estar associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e conseqüentemente pior prognóstico (Innocenzi *et al.* 2003).

Apesar das fortes evidências sugerindo que a síntese endógena de ácidos graxos seja essencial para a proliferação de células malignas, não se

conhece até o momento quais os mecanismos biológicos envolvidos. Em outras palavras, a maneira através da qual a intensidade da síntese endógena de lipídios interfere no ciclo celular, podendo causar apoptose, é um ponto que merece ser bastante estudado nos próximos anos. Neste contexto, Swinnen *et al.* (2003) demonstraram que a atividade enzimática de FAS é necessária para a produção dos fosfolipídios que compõe regiões especializadas das membranas das células LNCaP (uma linhagem celular derivada de um adenocarcinoma de próstata metastático) ricas em colesterol e proteínas, conhecidas como “lipid rafts”. Estas regiões são importantes para diversas funções celulares como transdução de sinais, tráfego intracelular, polarização celular, migração e formação de protusões da membrana (Ikonen *et al.*, 1998; Manes *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2000; Bagnat *et al.*, 2002). Portanto, a expressão e/ou atividade anormal de FAS podem causar profundos efeitos em várias vias de transdução de sinal e estimular diretamente o crescimento celular (Swinnen *et al.*, 2003; Baron *et al.* 2004). No presente trabalho nós mostramos, pela primeira vez, que as células de melanoma murino B16F10 produzem a enzima FAS em grande quantidade.

As observações mais importantes desta tese estão relacionadas ao fato de que a inibição da atividade de FAS reduz em 50% as metástases linfonodais espontâneas de melanoma em um modelo murino. O mecanismo responsável por este fenômeno merece ser estudado com maiores detalhes, entretanto, nossos achados podem estar relacionados à redução de proliferação e/ou aumento da morte das células B16F10 por apoptose. Está muito claro na literatura que inibidores específicos da atividade de FAS bloqueiam a progressão do ciclo celular e inibem a proliferação de várias linhagens celulares derivadas de tumores malignos (Pizer *et al.* 1996, Pizer *et al.* 1998, Pizer *et al.* 2000, Li *et al.* 2001, Gabrielson *et al.* 2001, Zhou *et al.* 2003, Agostini *et al.* 2004, Kridel *et al.* 2004, Knowles *et al.* 2004, Menendez *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005). A presença do Orlistat nos líquidos teciduais e nas circulações sanguínea e linfática, assim como seu acúmulo nos linfonodos da cavidade torácica, pode ter reduzido a viabilidade

das células tumorais circulantes, dificultando a formação das metástases. Outra possível explicação para nossos resultados pode residir no fato de que FAS seja capaz de interferir nos processos de angiogênese e/ou linfangiogênese. De fato, foi recentemente demonstrado por Browne *et al.* (2006) que a inibição de FAS com Orlistat em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) causou redução na proliferação ao mesmo tempo em que inibiu a angiogênese através do bloqueio indireto de VEGF pela inibição da exposição de seu receptor (VEGFR2/KDR/Flk1) na superfície celular. O modo pelo qual células metastáticas de melanoma invadem vasos linfáticos intra-tumorais não é totalmente conhecido, porém, Padera *et al.* (2002) levantaram a hipótese de que o aumento dos níveis de VEGF-C em linhagens celulares de fibrossarcoma de camundongo (T-241) e de melanoma de camundongo (B16F10) possa favorecer a linfangiogênese, aumentando o diâmetro dos vasos linfáticos e conseqüentemente gerando maiores oportunidades para a invasão de células neoplásicas. Em nosso modelo de estudo, a inibição de FAS ocorreu de forma sistêmica, como foi demonstrado pela coloração para lipídios realizada nos cortes de tumores primários e tecidos hepáticos dos animais tratados ou não com Orlistat. As metástases são as principais responsáveis pelo prognóstico ruim dos pacientes com câncer e estão intimamente associadas à redução de tempo de sobrevivência. Dentre os tumores malignos, o melanoma ocupa um lugar de destaque pela sua capacidade de se espalhar rapidamente para diversos órgãos vitais como fígado, pulmões, cérebro, ossos e intestino delgado, dentre outros. Os mecanismos de inibição de metástase no modelo de melanoma murino devem ser estudados em profundidade, pois esta, além de acentuada, ocorreu num tumor extremamente agressivo.

Não observamos redução do tamanho dos tumores primários nos animais estudados, embora isto seja difícil de quantificar em lesões difusas e espalhadas pelo peritônio. Estudos utilizando outros modelos, como injeções subcutâneas de células B16F10 (Chan *et al.*, 1988; Pizer *et al.*, 2000; Taniguchi *et al.*, 2001; Vantyghem *et al.*, 2003), podem ser extremamente úteis para a

elucidação do efeito do bloqueio de FAS no crescimento do tumor primário. A aplicação do amplamente utilizado modelo de injeção das células B16F10 na veia caudal de camundongos C57BL6 e contagem das colônias pulmonares (Chan *et al.*, 1988) poderá ser também importante para avaliar a intensidade do efeito da inibição de FAS sobre a disseminação do melanoma e está entre nossos objetivos futuros.

Decidimos utilizar a droga Orlistat para nossos estudos *in vivo* em substituição a cerulenina, que foi incluída apenas como controle nos estudos de cultura celular. O Orlistat já foi aprovado pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) para tratamento de obesidade e é produzido pela Roche (Basel, Suíça). Trata-se de um derivado semi-sintético da lepstatina, que é um inibidor irreversível das lipases gástricas e pancreáticas presentes no trato gastrintestinal (Guerciolini *et al.*, 1997) e que teve sua atividade como bloqueador de FAS descrita recentemente (Kridel *et al.* 2004). Esta substância possui propriedades anti-proliferativas e anti-tumorais em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata, mama (Kridel *et al.* 2004; Knowles *et al.* 2004) e estômago (Menendez *et al.* 2005) e em um modelo xenográfico de câncer de próstata (Kridel *et al.* 2004). Isto ocorre devido ao bloqueio de um dos sete sítios ativos da FAS (tioesterase), responsável pela liberação do palmitato (Smith *et al.*, 2003; Menendez *et al.* 2005, 2006).

Em nossos experimentos, o Orlistat extraído das cápsulas de Xenical provocou, além da diminuição no número de metástases para linfonodos mediastínicos, uma aparente fragmentação das lesões primárias. Em todos os animais tratados foram observados muitos fragmentos ou “ilhas” tumorais espalhadas pela cavidade peritoneal. Nossas análises microscópicas não detectaram invasão dos órgãos abdominais a partir das células que compõe estas “ilhas”, entretanto, isto pode ser uma questão de tempo, pois nossos experimentos foram de curta duração. A análise dos cortes histológicos corados com HE não revelou diferenças significativas entre os tumores primários tratados ou não com

Orlistat, a não ser pela menor quantidade de células com citoplasma claro e núcleo periférico, semelhantes à adipócitos. Um dos nossos objetivos futuros é realizar um estudo imunohistoquímico destes tumores para verificar diferenças na produção de moléculas reconhecidamente importantes para a patogênese dos melanomas, incluindo as de matriz extracelular. A presença de metástases pulmonares em um animal do grupo controle, confirmada através de exame histopatológico, sugere que além da disseminação linfática há espalhamento do tumor pela corrente sangüínea.

Nossos resultados obtidos *in vitro* com a linhagem B16F10 mostraram uma significativa inibição da proliferação e indução de apoptose. Isto está em concordância com os achados de Menendez *et al.* (2004, 2005), que demonstraram em linhagens celulares derivadas de carcinoma estomacal (NCI-N87) e de mama (SK-Br3) tratadas com Orlistat, inibição da síntese de ácidos graxos e bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1. Estes autores mostraram também que o Orlistat inibiu intensamente a expressão de ErbB2, através do aumento da proteína PEA-3, seu repressor transcricional, além de aumentar os níveis de p27^{Kip1}, proteína inibidora do ciclo celular. No presente trabalho, os resultados dos ensaios de western blot para avaliação das proteínas FAS, ErbB2, p27^{Kip1} e Skp2 foram similares aos descritos por Knowles *et al.* (2004) e Menendez *et al.* (2005). O tratamento da linhagem celular B16F10-C5T com Orlistat resultou em um acúmulo da proteína p27^{Kip1}, que é uma das principais proteínas responsáveis pela repressão do ciclo celular na fase G0/G1, e causou diminuição dos níveis da proteína Skp2, responsável pela ubiquitinação de p27^{Kip1}. Com relação a ErbB2, observou-se redução nos extratos protéicos preparados a partir de células tratadas com 100µM de Orlistat, sendo que as bandas mantiveram-se mais fracas que o controle até 200µM, aumentaram de intensidade em 300 e 400µM e diminuíram novamente com 500µM da droga, em concordância aos achados de Menendez *et al.* (2004) em linhagens celulares derivadas de câncer de mama e ovário (SK-Br3 e SK-Ov3), nas quais o tratamento com Orlistat reduziu

os níveis de ErbB2. Na menor concentração utilizada, Orlistat provocou um discreto aumento na quantidade da proteína FAS, em relação às células controle incubadas somente com etanol. A falta de atividade da enzima FAS pode ter gerado como resposta um aumento na sua transcrição ou mesmo a estabilização da proteína FAS com aumento da sua meia-vida. Por outro lado, isto pode também ter causado redução na quantidade de ErbB2, pois já está demonstrada uma conexão direta entre estas duas proteínas através de experimentos realizados por Kumar-Sinha *et al.* (2003), em células derivadas de epitélio de glândula mamária.

As análises feitas em citômetro de fluxo mostraram que houve inibição na progressão do ciclo celular, a qual foi dependente da dose de Orlistat, achado similar ao de Menendez *et al.* (2005) em células derivadas de câncer de mama (SK-Br3). Outros inibidores de FAS, como a cerulenina e C75 têm efeito semelhante em linhagens celulares derivadas de células tumorais (Kuhajda *et al.*, 1999, 2000; Pizer *et al.*, 2000; Gabrielson *et al.*, 2001; Heiligttag *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). A porcentagem de células apoptóticas, em comparação aos controles, aumentou 42,2% com 250 μ M e 265% com 500 μ M de Orlistat, demonstrando que a inibição da síntese endógena de ácidos graxos causa apoptose em células B16F10, como tem sido claramente demonstrado para várias outras linhagens tumorais (Pizer *et al.*, 1996; Pizer *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Thupari *et al.*, 2001; Gabrielson *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2003; Kridel *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2005; Menendez *et al.*, 2005).

Em resumo, os resultados aqui apresentados mostram que a injeção intraperitoneal de células B16F10 em camundongos C57BL6 constitui um bom modelo para o estudo de drogas com efeito anti-tumoral, como o Orlistat. Evidenciam também que o bloqueio da atividade da enzima FAS pelo Orlistat inibe significativamente a incidência de metástases espontâneas destes melanomas experimentais a partir da cavidade peritoneal para os linfonodos do mediastino.

Além do mais, a inibição de FAS promove o bloqueio do ciclo celular nas células B16F10 e causa apoptose.

7. CONCLUSÕES

1. Camundongos C57BL6 que receberam implantes de células B16F10 e foram tratados com Orlistat apresentaram uma diminuição de 50% no número de metástases experimentais para os linfonodos mediastínicos, em comparação aos animais controle.
2. O tratamento dos camundongos C57BL6 com Orlistat, pela via intraperitoneal, causou inibição sistêmica na síntese endógena de lipídios.
3. As metástases experimentais provocadas pelo implante de células B16F10 em camundongos C57BL6 podem ocorrer pelas vias linfática ou hematogênica.
4. A linhagem celular derivada de melanoma de camundongo B16F10 expressa FAS. Não há um padrão definido de expressão de FAS quando se compara células B16F10 originadas de tumores primários ou de suas metástases.
5. O tratamento das células B16F10 com Orlistat aumentou a quantidade da proteína p27^{Kip1} ao mesmo tempo em que reduziu a de Skp2.
6. A expressão das proteínas FAS e ErbB2 na linhagem B16F10 foi modulada pela exposição do Orlistat.
7. O tratamento das células B16F10 com Orlistat inibiu a proliferação e causou apoptose.

Referências *

-Agostini M, Silva S, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M *et al.* Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2004; 40 (7): 728-735.

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

-Alo' PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, *et al.* Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep* 2000; 7 (6): 1383-1388.

-Alo' PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 1996; 77 (3): 474-482.

-Alonso RS, Ortiz P, Pollan M, Perz-Gomes B, Sanchez L, Acuna MJ *et al.* Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 2004; 164 (1): 193-203.

-Ando H, Funasaka Y, Oka M, Ohashi A, Furumura M *et al.* Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. *J Lipid Research* 1999; 40: 1312-1316.

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

-Bagnat M, Simons K. Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci USA* 99

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

(2002): 1483-1488.

-Bancroft JD, Stevens A, Turner DR. Theory of histological techniques. 1990 3th edition [12 lipids] 215-244.

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

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

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

-Berne RM, Levy MN. *Physiology*. 4. ed. St. Louis: Mosby, Inc; 1998: 877-882.

-Bodey B, Bodey B Jr, Groger AM, Luck JV *et al.* Clinical and prognostic significance of the expression of the c-erbB-2 and c-erbB-3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas. *Anticancer Res. Anticancer Res* 1997; 17 (2B): 1319-1330.

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

-Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promotor. I. Identification of the protein and delination of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* 1993; 268 (19):14490-14496.

-Brink J, Ludtke ST, Yang Chao-Yuh, Gu Zei-Wei, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 99 (1): 138-143.

-Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89 (3): 331-340.

-Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cell and blood. *PNAS* 1999; 96 (20): 11041-11048.

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

-Chambon M, Rochefort H, Vial HJ, Chalbos D. Progestins and androgens stimulate lipid accumulation in T47D breast cancer cells via their own receptors. *J Steroid Biochem* 1989; 33: 915-922.

-Chalbos D, Chambon M, Ailhaud G, Rochefort H. Fatty acid synthase and its mRNA are induced by progestins in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 9923-9926.

-Chan WS, Page CM, Maclellan JR, Turner GA. The growth and metastasis of four commonly used tumor lines implanted into eight different sites: evidence of site and tumor effects. *Clin Expl Metastasis* 1988; 3: 233-244.

-Chenevix-Trench G, Martin NG, Ellen KA. Gene expression in melanoma cell lines and cultured melanocytes: correlation between levels of c-src-1, c-myc and p53. *Oncogene* 1990; 5 (8): 1187-1193.

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

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

-Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K *et al.* Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the

heterozygotes die in utero. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100 (11): 6358-6363.

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

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

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

-De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W *et al.* RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. Cancer Research 2003; 63 (13): 3799-3804.

-DiSorbo DM. Effect of triamcinolone acetonide on the growth of NEL-M1 human melanoma cell cultured in the presence and absence of growth stimulatory agents. Cancer Research 1986; 46 (8): 3964-3968.

-Eclees SA. Cell biology of lymphatic metastasis. The potential role of c-erbB oncogene signaling. Recent Results Cancer Research 2000; 157: 41-54.

-Eliopoulos P, Mohammed MQ, Henry K, Retsas S. Overexpression of HER-2/neu in thick melanoma. Melanoma Res 2002; 12 (2): 139-145.

-Epstein JI, Carmichael M, Partin AW. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. Urology 1995; 45 (1): 81-86.

-Erckon CA. From the crest to the periphery: Control of pigmented cell migration and lineage segregation. Pigment Cell Res 1993; 6: 336-347.

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

-Fink-Puches R, Pilarski P, Schmidbauer U, Kerl H, Soyer HP. No evidence for c-erbB-2 overexpression in cutaneous melanoma. *Anticancer Res* 2001; (4A): 2793-2795.

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

-Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res* 1997; 17 (6D):4589-4593.

-Florenes VA, Maelandsmo GM, Kerbel RS, Singerland JM, Nesland JM, Holm H. Protein expression of cell cycle inhibitor p26kip1 in malignant melanoma. *Am Journal of Pathology* 1998; 153 (6): 305-12.

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

-Gansler TS, Hardman W 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol* 1997; 28 (6): 686-692.

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

-Guo CB, Cui NB, Yu GY, Liu DX, Meng SC, Song Q. Effects of cerulenin on the endogenous fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 2003, 61 (8): 909-912.

-Hata T, Sano Y, Matsumae A, Kamio Y, Nomura S, Sugawara R. Study of new antifungal antibiotic. *Jpn J Bacteriol* 1960a; 15: 1075-1077.

-Hata T, Matsumae A, Nomura S, Kim T, Ryan K. Studies on cerulenin, a new antifungal antibiotic. II. Biological characteristic and therapeutic effect of cerulenin. *Jpn J Med Mycol* 1960b; 1: 382-383.

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

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

-Heemers H, Vanderhoydonk F, Roskans T, Shechter WH, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues *in vivo*. *Mol Cell Endoc* 2003; 205 (10): 21-31.

-Heenem M and Laporte M. Molecular markers associated to prognosis of melanoma. *Ann Dermatol Venereol* 2003; 130 (11): 1025-1031.

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

-Hicks MJ, Flaitz CM. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncology* 2000; 36: 152-169.

-Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The erbB receptors and their role in cancer progression. *Experim Cell Res* 2003; 284 (1): 99-110.

- Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 1091-1095.
- Ikonen E, Simons K. Protein and lipid sorting from *trans*-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells, *Semin Cell Dev Biol* 9 (1998): 503-509.
- Instituto Nacional de Câncer – Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2006, disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2006/> [acessado 2007 Jan. 05].
- Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastián V, Silipo V, La Torre G *et al.* Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol* 2003; 30 (1): 23-28.
- Ivan D, Diwan AH, Esteva FJ, Prieto VG. Expression of cell cycle inhibitor p27^{kip1} and its inactivator Jab1 in melanocytic lesions. *Mod Pathol* 2004; 17 (7): 811-8.
- Jayakumar A, Tai M, Huang W, Al-Fell W, HSU M, Abu-Elheiga L, Chirala SS, Wakil, SJ. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 (19): 8695-8699.
- Jimbow K, Quevedo Jr WC, Fitzpatrick T, Szabo G. *In Dermatology in General Medicine* (eds. Fitzpatrick, T. B. *et al.*) 261–289 (McGraw-Hill, Inc, New York, 1993).
- Kamijo T, *et al.* Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 8292-8297.
- Kapur P, Rakheja D, Roy LC, Iloang MP. Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. *Modern Pathol* 2005; 18: 1107-1112.
- Katz KA, Jonasch E, Hodi FS, Soiffer R, Kwitkiwski K, Sober AJ, Haluska FJ. Melanoma of unknown primary: experience at Massachusetts General Hospital and Dana-Farber Cancer Institute. *Melanoma Research* 2005; 15 (1): 77-82 review

- Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2001; 2: 282-286.
- Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the c-erbB/HER signalling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Research* 2000; 77: 25-79.
- Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem* 2004; 279 (29): 30540-30545.
- Kokoschka EM, Spona J, Knobler R. Sex steroid hormone receptor analysis in malignant melanoma. *Br. J Dermatol.* 1982; 107 (23): 54-59.
- Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE *et al.* Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; 21 (4): 325-329.
- Kridel SJ, Axelrod F, Rosenkrants N, Smith W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Research* 2004; 64: 2070-2075.
- Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. 2000; *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 (7): 3450-3454.
- Kuhajda FP. Fatty acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2000; 16 (3): 202-208.
- Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: New application of an old pathway. *Cancer Research* 2006; 66 (12): 5977-5980. review

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

-Kumar V, Schneider NR and Hagler HK. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th edition, Elsevier Saunders 2004.

-Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology* 2002; 40 (1): 71-79.

-Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression: potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem* 2001; 276 (15): 11512-11516.

Lee DK, Chang C. Endocrine Mechanisms of disease. Expression and degradation of androgen receptor: mechanisms and clinical implication. *J Clinical Endocrinology of Metabolism* 2003; 88 (9): 4043-4054.

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

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

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

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

-Loda M, Cukor B, Tam SW *et al.* Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med* 1997; 3: 231-234.

-Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 2000; 288 (5475): 2379-2381.

-Lloyd RV, Erikson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Chevile JC, and Cheithauer BW. p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancer. *Am J Pathol* 1999; 154: 313-323.

-Magnifico A, Tagliabue E, Ardini E, Casalini P, Colnagui MI, Menard S. Heregulin β 1 induces the down regulation and the ubiquitin proteasome degradation pathway of p185HER2 oncoprotein. *FEBS Letters* 1998; 422 (2): 129-131.

-Manes S, Mira E, Gomes-Mouton C, Lacalle RA, Keller P *et al.* Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *EMBO J* 1999; 18: 6211-6220.

-Mandelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2787-2799.

-MacKie RM, Freudenberger T, Aitchison TC. Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 2: 487-490.

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

-Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue IV: A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Research* 1953; 13: 27-29.

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

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

-Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral action of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA-3 mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol* 2005b; 3 (may).

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

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

-Menendez JA, Lupu R. Oncogenic properties of the endogenous fatty acid metabolism: molecular pathology of fatty acid synthase in cancer cells. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006b; 9: 346-357.

-Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997; 3 (11): 2115-2120.

-Morvillo V, Luthy IA, Bravo AI, Capurro MI, Portela P, Calandra RS, Mordoh J. Androgen receptors in human melanoma cell lines IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN and in human melanoma metastasis. *Melanoma Research* 2002; 12 (6): 529-538.

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

-Nordlund JJ. The lives of pigmented cells. *Dermatol Clin* 1986; 4: 407-418.

-O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression and regulation of c-erbB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 2000; 88 (5): 759-765.

-O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 2002; 38(7): 627-640.

-O'Malley B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endoc* 1990; 4 (3): 363-369.

-Ômura S. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Am Soc Microbiol* 1976; 3 (40): 681-697.

-Ookhtens M, Kannan R, Lyon I, Baker N. Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1984; 274: R146-R153.

-Padera TP, Kadambi A, Tomaso E, Carreira CM, Brown EB *et al.* Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883-1886.

-Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2858-2865.

- Pegram MD, Lipton A, Hayes DF *et al.* Combination therapy with trastuzumab (herceptin) and cisplatin for chemoresistant metastatic breast cancer: Evidence for receptor-enhanced chemosensitivity. *Semin Oncol* 1999; 26 (suppl 12): 89-95.

- Penuel E, Schaefer G, Akita RW, Sliwkowski MX. Structural requirements for ErbB2 transactivation. *Semin Oncology* 2001; 28 (6): 36-42.

- Persons DL, Aber DA, Sosman JA, Borelli KA, Slovak ML. Amplification and overexpression of HER-2/neu are uncommon in advanced stage melanoma. *Anticancer Res* 2000; 20 (3B): 1965-1968.

- Phillip-Staheli J, Kim KH, Payne SR, Gurley KE, Liggitt D, Longton G and Kemp CJ. Pathway-specific tumor suppression. Reduction of p27 accelerates gastrointestinal tumorigenesis in APC mutant mice but not in Smad3 mutant mice. *Cancer cell* 2002; 1: 355-368.

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

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

- Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL *et al.* Malonyl-coenzyme is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Research* 2000; 60 (2): 213-218.

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

-Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massagué J, Roberts JM and Koff A. p27 a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Desenvol* 1994; 8: 9-22.

-Potti A, Hille R, Koch M. Immunohistochemical determination of HER-2/neu in malignant melanoma. *Anticancer Res* 2003; 23 (5A): 4067-4069.

-Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C. 1992. [Lipids, 177 Johnson FB]

-Quevedo Jr. WC, Fleischmann RD. Developmental biology of mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol* 1980; 75: 116-121.

-Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol*. 1999; 40: 35-42.

-Hangan VS, Joshi AK, Smith S. Mapping the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation *in vitro*. *Biochemistry* 2001; 40 (36): 10792-10799.

-Hicks MJ, Flaitz CM. Oral mucosa melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncology* 2000; 36: 152-169.

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

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

-Rongcun Y, Onfray FS, Charo J *et al*. Identification of new HER-2/neu-derived peptide epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas. *J Immunol* 1999; (163): 1037-1044.

- Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, Symmans *et al.* Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3(5): 573-585.
- Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Dei Tos AP, Fletcher JA, Loda M. Gastrointestinal stromal tumors overexpress fatty acid synthase. *J Pathol* 2006; 209: 369-375.
- Sabine JR, Abraham S, Chaikoff IL. Control of lipid metabolism in hepatomas: insensitivity of rate of fatty acid and cholesterol synthesis by mouse hepatoma BW7756 to fasting and to feedback control. *Cancer Research* 1967; (27): 793-799.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 31-39.
- Singerland J and Pagano M. Regulation of cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J cell Physiol* 2000; 183: 10-17.
- Schrump DS, Cheng GA, Consuli U, Jin X, Roth JA. Inhibition of esophageal cancer proliferation by adenovirally mediated delivery of p16INK4. *Cancer Gene* 1996; 3: 357-364.
- Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-1065.
- Sherr CJ, Roberts JM. Positive and negative regulation by CDK inhibitors. *Gene Desenv* 1999; 13: 1501-1512.
- Sherr CJ. The pezcoller lecture : Cancer cell cycle revisited. *Cancer Research* 2000; 60: 3689-3695.
- Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA *et al.* Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncology* 2004; 40: 688-696.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235 (4785): 177-182.

-Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SJ et al. Studies of HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244 (4905): 707-712.

-Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpress HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783: 792.

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

-Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A et al. A formation p27-cdk complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell growth Differ* 1996; 7: 135-146.

-Stoops JK, Wakil SJ. Animal fatty acid synthase. A novel arrangement of the β -ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *Journal of Biol Chem* 1981; 256 (10): 5128-5133.

-Swinnen JV, Ullrich W, Heyns W, Verhoeven G. Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: evidence of a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *PNAS* 1997; 94: 12975-12980.

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

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

-Swinnen JV, Heemers H, Doboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene* 2000b (19) 5173-5181.

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

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

-Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of Fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9 (6): 2204-2212.

-Taniguchi S, Takeoka M, Ehara T, Hashimoto S, Shibuki H *et al.* Structural fragility of blood vessels and peritoneum in calponin h1-deficient mice, resulting in an increase in hematogenous metastasis and peritoneal dissemination of malignant tumor cells. *Cancer Research* 2001; 61: 7627-7634.

-Tateishi M, Ishida T, Mitsodomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Immunohistochemical evidences of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Research* 1990; 50: 7077-7080.

-Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 365: 687-701.

-Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 1993; 14 (4): 459-479.

-Tsukamoto Y, Wong H, Mattick JS, Wakil SJ. The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. *J Biol Chem* 1983; 258 (24): 15312-15322.

-Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 1999; 50: 401-423.

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

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

-Visca, P.; Sebastiani, V.; Pizer, E. S.; Botti, C.; De Carli, P.; Filippi, S.; Monaco, S.; Alo', P. L. Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23 (1A): 335-339.

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

-Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 719-726.

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

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

-Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of the low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterisation. *J Biol Chem* 1993; 268 (19) 14497-14504.

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

-Warbug O, Posener KEN. Uber den Stoffwechsel der carcionomzelle. *Biochem Z* 1924; 152: 309-344.

-Yarden Y. Biology of HER-2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001; 61 (supp1) 2: 1-13.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 732-1, sobre "ANÁLISE DO PAPEL DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FAS) NO PROCESSO METASTÁICO DE MELANOMA EM MODELO MURINO (B16F10/C57BL6)" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edgard Graner / Marco Antonio Carvalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 07 de Outubro de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 732-1, entitled "STUDY OF FATTY ACID SYNTHASE (FAS) EXPRESSION IN THE METASTATIC PROCESS USING A MOUSE MELANOMA MODEL (B16F10/C57BL6)", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 7, 2004.

Campinas, 07 de outubro de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

Classification: Biological Sciences, Medical Sciences

Antimetastatic activity of the fatty acid synthase inhibitor Orlistat in a mouse melanoma model

Marco A. Carvalho^{*}, Karina G. Zecchin[†], Fabiana Seguin^{*}, Débora C. Bastos^{*}, Ana Lúcia C. A. Rangel^{*}, Sílvio S. Veiga[‡], Massimo Loda[§], Ricardo D. Coletta^{*}, and Edgard Graner^{*¶}

^{*}Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Avenida Limeira 901, CP 52, Areão, Piracicaba, SP, 13414-018, Brazil.

[†]Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brazil.

[‡]Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

[§]Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute and Pathology Department, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

[¶]To whom correspondence should be addressed. E-mail: egraner@fop.unicamp.br

Number of text pages:

Number of Figures:

Number of Tables:

Word and character counts:

Author contributions: E.G. designed research; M.A.C., K.G.Z., F.S., D.C.B., A.L.C.A.R., and E.G. performed research; E.G., R.D.C., ML, and S.S.V. analyzed data; E.G. wrote the paper.

The authors declare no conflicts of interest.

Fatty acid synthase (FAS) is the anabolic enzyme responsible for the endogenous synthesis of the saturated fatty acid palmitate from acetyl-CoA and malonyl-CoA. In contrast to most normal cells, malignant cells depend on FAS activity for growth and survival. In fact, FAS is overexpressed in a variety of human cancers including cutaneous melanoma, in which its levels of expression are associated with a poor prognosis and depth of invasion. Here, we show that the specific inhibition of FAS activity by the anti-obesity drug Orlistat is able to significantly reduce proliferation and promote apoptosis in the mouse metastatic melanoma cell line B16-F10. These results prompted us to verify the effect of FAS inhibition on the metastatic process in a mouse model of spontaneous melanoma metastasis, in which B16-F10 cells injected in the peritoneal cavity of C57BL/6 mice metastasize to the mediastinal lymph nodes. We observed that mice treated with Orlistat forty eight hours after the inoculation of B16-F10 cells exhibited a 52% reduction in the number of mediastinal lymph node metastases, in comparison with the control animals. These results suggest that FAS activity is essential for B16-F10 melanoma cell proliferation while its inactivation by Orlistat significantly reduces their metastatic spread. The chemical inhibition of FAS activity could have a potential benefit in association with the current chemotherapy for melanoma.

melanoma / fatty acid synthase / metastasis / Orlistat / B16-F10 cells / mouse

Endogenous fatty acid synthesis from the small carbon precursors acetyl-CoA and malonyl-CoA is dependent on the activity of fatty acid synthase (FAS, EC2.3.1.85). In most of the cells, FAS is down-regulated by the dietary fatty acids, with exception of lipogenic tissues as liver, lactating breast, fetal lung and adipose tissue (1, 2). Recent studies provide compelling evidence that neoplastic lipogenesis is essential for cancer cell survival. In fact, several human epithelial malignancies, such as those of prostate, breast, ovarian, bladder, lung, stomach and oral cavity, melanoma as well as soft tissue sarcomas overexpress FAS (3-16). For some of these tumors, such as prostate, breast, and ovarian cancers and melanoma (4, 5, 9, 12) FAS overexpression has also been associated with a poor prognosis. Experimental studies have shown that FAS inhibition reduces cell proliferation by blocking DNA replication during S-phase, induces apoptosis (17-20), and decrease the size of prostate, ovarian and breast cancer xenografts (3, 21, 22). In addition, the inhibition of FAS activity has a chemopreventive effect in the breast cancer transgenic neu-N mouse model (23). Orlistat (tetrahydrolipstatin), an irreversible inhibitor of pancreatic and gastric lipases clinically used due its anti-obesity properties, was recently demonstrated to block the activity of the thioesterase domain of FAS (24) and consequently reduce proliferation and promote apoptosis in prostate, breast and stomach cancer cell lines (24-27). Moreover, Orlistat has shown anti-tumor activity by inhibiting the growth of prostate cancer xenografts (24).

The regulation of FAS abundance in cancer cells is complex and occurs at the transcriptional or post-translational levels. Progesterone stimulates FAS expression in breast cancer cell lines (28) whereas androgens or epidermal-growth factor (EGF) up-regulate FAS expression and activity in the androgen-dependent prostate cancer cell line LNCaP (29-32). On the other hand, the FAS protein can be degraded by the ubiquitin-proteasome system, in a process that is controlled by its interaction with the deubiquitinating enzyme USP2a (33).

Malignant melanoma is a chemotherapy-resistant aggressive tumor that arises in the skin and less frequently affects oral and anogenital mucosa, esophagus, meninges and the eyes. The incidence of this type of skin cancer has increased during the last 50 years in the

United States (34) and the high mortality rates are directly associated with its intrinsic ability to metastatically spread to other organs. Immunohistochemical detection of the FAS protein has been recently associated with Breslow thickness, suggesting a poor prognosis for patients affected by cutaneous melanoma (12). In this work we present evidence that FAS activity is necessary for the proliferation of the highly metastatic murine melanoma B16-F10 cells. In addition, we show that FAS specific inhibition with the anti-obesity drug Orlistat promotes apoptosis and reduces B16-F10 spontaneous metastasis from the peritoneal cavity to the mediastinal lymph nodes of C57BL/6 mice.

Results

FAS Activity is Necessary for the Proliferation and Survival of B16-F10 Cells. As depicted in Fig. 1A and B, FAS protein was easily detected by indirect immunofluorescence in regularly growing B16-F10 melanoma cells, which were characterized by a finely granular positivity uniformly distributed throughout the cytoplasm. In order to verify whether the specific inhibition of FAS activity can modify the growth rate of these cells, the natural and specific FAS inhibitor cerulenin or Orlistat were added to the culture medium. Fig. 1C shows that 5 μ g/ml of cerulenin significantly reduced cell proliferation in comparison with the respective DMSO control ($P < 0.001$, Mann-Whitney test). On the other hand, Orlistat in concentrations ranging from 100 to 750 μ M did not affect B16-F10 cell growth in standard culture conditions (cell culture medium supplemented with 10% FBS, data not shown). Since these cells proliferate extremely rapidly, we reduced the FBS concentration to 2% and then noticed an important effect of Orlistat, which inhibited the cell growth at 250 μ M ($P < 0.001$, Mann-Whitney test; Fig. 1D). Thereafter, all the experiments were performed in low serum concentration. The results from the proliferation curves were further confirmed by the experiment shown in Fig. 2H, in which B16-F10 cell growth was reduced in the presence of 100 or 250 μ M of Orlistat, whereas concentrations higher than 500 μ M were cytotoxic. In order to better characterize the anti-proliferative properties of Orlistat on B16-F10 mouse melanoma cells, we next performed flow cytometry experiments, which showed a gradual increase over time (from 0 to 48h) of the

G0-G1 population as well as a clear decline of the S phase, in comparison with untreated cells. Fig. 1E illustrates the percentage of cells in each phase of the cell cycle after 36h of incubation in cell culture medium containing 250 or 500 μ M of Orlistat. Indeed, western blotting analysis of protein lysates obtained from cells grown under the same conditions showed accumulation of p27^{Kip1}, a negative regulator of the G1/S transition, and a down-regulation of Skp2, which is essential for the proteasome degradation of p27^{Kip1} (data not shown). In addition, the endogenous synthesis of fatty acids is important for B16-F10 cell survival, since cells grown in the presence of at 250 or 500 μ M of Orlistat for 20h had an increase of 42.2 and 265%, respectively, of apoptotic cell death over the control values (Fig. 1F).

To verify the effectiveness of Orlistat in order to block FAS activity in B16-F10 cells, we first used Oil Red O staining. In contrast with the LNCaP cells used as positive controls (36), in which lipid droplets were clearly stained, we were not able to observe lipid accumulation in the cytoplasm of B16-F10 cells. These results can be possibly explained by the very high metabolic rates of cultured melanoma cells or by their comparatively low activity of this anabolic pathway, in comparison with the prostate cancer cells. Considering that the saturated fatty acid palmitate (C16:0, the end-product of FAS) is able to protect tyrosinase from proteasomal degradation and thus regulate the melanin content of B16-F10 cells (37, 38), we next performed melanin extractions from cells grown in the presence of different concentrations of Orlistat. Indeed, as shown in Fig. 2F and G control B16-F10 cell pellets (treated with ethanol only) had a dark gray or black color whereas the cell pellets obtained from Orlistat-treated cultures contained less melanin, being almost completely discolored at 500 and 750 μ M. These results clearly showed that FAS activity is specifically inhibited by Orlistat in a dose-dependent manner leading to the reduction of the melanin synthesis, phenomenon that can be attributed to the previously demonstrated effect of palmitate on tyrosinase half-life (37, 38). At the end of the incubations with Orlistat, cells were counted and, as expected, a strong reduction of the cell growth was observed at 100 and 250 μ M, whereas 500 and 750 μ M of the drug caused cell death (Fig. 2H). In addition to its effects on melanin synthesis and cell growth, FAS inhibition promoted

morphological changes in B16-F10 cells, which were evidenced by the scarce cytoplasm and longer cell projections of the Orlistat-treated cells in comparison with control cells (Fig. 2A-E). At the highest concentration of the drug B16-F10 cells became predominantly fusiform (Figures 2D and E).

FAS Inhibition Reduces Spontaneous Lymph Node Metastasis from the Peritoneal Cavity. Approximately 14 days after intraperitoneal (IP) inoculation of B16-F10 cells all mice showed abdominal enlargement, which was variable in size and shape. Despite the well characterized anti-obesity properties of Orlistat, there were no significant weight differences between the control and treated groups (data not shown). This fact may be associated with the route of administration (IP), since when Orlistat is orally used its effects are confined into the gastrointestinal tract (39). Another possible explanation could be the short period of treatment, since in this experimental model the animals die 12-15 days after B16-F10 cell inoculation due to the aggressive tumor growth in the peritoneal cavity. However, it is worth mentioning here that mice from the Orlistat-treated group showed slower locomotor activity than the control animals few days before the sacrifice, probably due to unknown systemic side effects of the drug. The abdominal primary tumors of the control mice consisted of a soft mass generally found at the side of the cell injections (Fig. 3A). In contrast, primary tumors from Orlistat-treated mice were in small groups distributed throughout the peritoneal cavity (Fig. 3B and D, Table 1). Histological examination confirmed that these islands of tumor tissue were not invading the abdominal organs. One animal from the treated group did not develop primary tumor (Table 1). Macroscopic examination of the thoracic cavity allowed the quantification of mediastinal lymph nodes with melanoma metastases (Fig. 3C, F and G), histologically confirmed (Fig. 4G). After three independent experiments, Orlistat-treated mice had 52% less metastatic mediastinal lymph nodes than the control animals, with 75 and 39 metastatic lymph nodes found in the control and Orlistat-treated group, respectively (average of 3.57 per animal in the control group and 1.95 per animal in the Orlistat-treated group; $P < 0.001$, t-test) (Fig. 3F and G, Table 1). One animal of the control group had macroscopic metastatic foci in its left

lung, microscopically confirmed (Fig. 4H). In order to check if the IP injections of Orlistat were systemically effective in the studied animals, frozen sections from the liver of treated or control mice were stained with Oil Red O. As depicted in Fig. 4A and B, the hepatocytes of control mice were rich in lipid droplets, in contrast with the weakly stained sections of Orlistat-treated mice. Indeed, small vacuoli probably corresponding to the lipid-containing vesicles in the hepatocytes of the control animals were also observed in paraffin sections stained with H&E (data not shown).

Furthermore, frozen sections of the primary tumor tissues exhibited adipose cells strongly stained with Oil Red O in the control tumors (Fig. 4C and E). Fewer adipose cells were present in Orlistat-treated primary tumors in comparison with the control tumors, which were weakly stained or even negative for Oil Red O (Fig. 4D and F). These results strongly suggest that Orlistat was effective to reduce FAS activity. Interestingly, melanin accumulation in the tumor cells infiltrating the mediastinal lymph nodes of the control mice was more evident than in lymph nodes from Orlistat-treated animals (data not shown), observation that further substantiate the effectiveness of FAS inhibition.

Discussion

In the present study we assessed the role of *de novo* fatty acid synthesis in melanoma cell growth and metastatic capacity in an animal model. We demonstrated that FAS is expressed by murine melanoma B16-F10 cells and is essential for their proliferation and survival, since FAS inhibition significantly reduced the cell growth and promoted apoptosis. Importantly, this work suggests that FAS activity has a role in the spontaneous metastatic spread of B16-F10 cells from the peritoneal cavity of C57BL/6 mice through the lymphatic circulation.

Clinicopathological and experimental data indicate that FAS is a potential chemotherapeutic or chemopreventive target for several human malignancies. FAS is essential during embryogenesis, since *Fasn*^{-/-} and *Fasn*^{+/-} mice die *in utero* even in the presence of a diet rich in saturated fatty acids (40). Its expression is up-regulated in a variety of human cancers and seems to be a prognostic marker for some of these tumors (3-

16). The intensity of FAS immunohistochemical positivity is stronger in human malignant melanoma than in conventional nevi or Spitz nevi (35), being associated with the Breslow thickness (12, 35) and suggested as a molecular prognostic marker (12). Moreover, FAS was among 128 differentially expressed genes in a cDNA microarray study of adenocarcinoma metastatic tissues (41). Although the exact role of FAS in malignant cells is not elucidated, it is clear that FAS specific inhibitors block cell cycle progression and cause apoptosis in many cancer cell lines (17-19) and are capable of decreasing the size of prostate and ovarian cancer xenographs (3, 21, 24). Moreover, FAS has a role in the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant microdomains in LNCaP cells, which are implicated in signal transduction, intracellular trafficking, and cell polarization and migration (42).

The site of tumor cell implantation may affect in many ways the distribution and number of metastases. In the present work we chose to ectopically inject the highly metastatic B16-F10 melanoma cells (43, 44) in the peritoneal cavity of C57BL/6 mice based on our previous observation that in this way mediastinal metastatic lymph nodes are detected in almost all cases (Veiga SS, unpublished results). Therefore, this seems to be a good model for the study of new antimetastatic drugs. IP inoculation of the B16 melanoma-derived BL6 cell line in C57BL/6 mice has been previously shown to promote metastasis in the lungs, spleen and thymus (45) while B16-F10 cells have been used to produce metastasis after subcutaneous or intravenous implantation in mice (46-48). In the present study, the size of the primary tumors was not evaluated because of their diffuse mode of growth inside the peritoneal cavity. Interestingly, in contrast with the relatively well circumscribed primary tumors observed in the control animals, Orlistat-treated tumors were more dispersed among the abdominal organs. The biological mechanisms by which FAS inhibition with Orlistat caused these macroscopic differences still need to be elucidated. Primary tumors from both studied groups were histologically similar and characterized by the presence of many mitotic cells, intense melanin accumulation, extensive areas of necrosis, and neoangiogenesis. Here, we demonstrate that FAS inhibition by Orlistat significantly reduces metastasis to mediastinal lymph nodes, which were easily localized

due to their enhanced size and black color. The exact role of FAS activity in the metastatic process is still unknown. It is possible to speculate that Orlistat reduced metastasis in the present study as a consequence of the cell growth inhibition or enhanced apoptosis in the primary tumor. Additionally, the drug may reduce cell viability in the lymphatic or blood circulation or even interfere with their growth and colonization in the lymph node sinus. As used in the present study the blood levels of Orlistat may reach 16 μ M (24), in contrast with the higher effective concentrations observed in our cell culture experiments (250-500 μ M). Indeed, B16-F10 cells were more resistant to FAS interference by Orlistat than prostate or breast cancer cell lines (24, 27). The abdominal lymphatic drainage of the daily Orlistat intraperitoneal injections may provide high concentrations of the drug in the mediastinal lymph nodes and hence reduce metastatization. Histological examination of the metastatic mediastinal lymph nodes revealed more melanin accumulation in the tumor cells of control animals than in the Orlistat-treated ones, which may indicate effective FAS inhibition.

Taken together, the results here presented suggest that FAS is a potential chemotherapeutic target for melanoma. Further studies using orthotopic melanoma cell implantation will be necessary to the better understanding of the role of the endogenous neoplastic lipogenesis in melanoma cell progression and metastasis. Additionally, there is a need for the characterization of the systemic and possible side effects of this new route of Orlistat administration.

Material and Methods

Cell Culture. B16-F10 murine melanoma cells were maintained in RPMI medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and antibiotic/antimycotic solution (Invitrogen) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. In order to block FAS activity cerulenin (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) or Orlistat (Xenical[®], Roche, Switzerland) were added to the culture medium at the concentrations described in the figure legends. For the proliferation curves cells were seeded in 24-well plates (5x10³/well) in RPMI containing 10% FBS and

incubated in serum-free medium for 24h. After that, RPMI containing FBS plus FAS inhibitors or their respective controls (dimethylsulfoxide - DMSO - or absolute ethanol) was added and cells from triplicate wells were trypsinized and counted in an automated cell counter (Coulter Counter Z1, Beckman, CA, USA).

Preparation of Orlistat Solutions. For cell culture experiments, Orlistat was extracted from Xenical capsules according to Knowles et al. (27). Each pill was solubilized in 1 ml of ethanol, insoluble products removed by centrifugation (12,000 xg for 5 min) and the supernatant (250 mM of Orlistat) stored at -80°C. Mice were treated with Orlistat solutions prepared according to Kridel et al. (24) with some modifications. Briefly, the content of each capsule (120 mg) of Orlistat was solubilized in 33% ethanol during approximately 30 min and vortexed every 10 min. After centrifugation for 5 min at 12,000 xg, supernatants were retrieved and stored at -80°C.

Indirect immunofluorescence. B16-F10 cells (2×10^4 /well) were plated in 8-well chamber slides (Lab Tek, Nunc, Naperville, IL, USA) and grown for approximately 24 h. After fixation in 3.7% paraformaldehyde, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 1 h at room temperature with anti-FAS primary antibodies (Transduction Laboratories, Lexington, KI, USA) diluted at 1:250 in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma). Cells were washed with PBS, incubated with FITC-conjugated anti-mouse IgG (1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 1 h, washed again and mounted in Vectashield with DAPI (Vector Laboratories). Documentations were made in a Leica DMR microscope equipped with epifluorescence (Leica Microsystems, Germany).

Flow cytometry. Samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipped with an argon laser and CellQuest software (version 4.1). Ten thousand events were collected for each sample. B16-F10 cell populations were identified by their light-scattering characteristics, enclosed in electronic

gates, and analyzed for the intensity of the fluorescent probe signal. Cells were harvested (10^6 cells/ml), washed with PBS and resuspended in a binding buffer containing annexin V-FITC (1:500). Apoptosis was quantified by FACS analysis as the number of annexin V-FITC positive cells. For cell cycle analysis B16-F10 cells were seeded in 100 mm dishes and serum starved for 24 h. After this period, cell culture medium supplemented with 10% of FBS plus Orlistat or ethanol was added and kept for different periods of time. Cells were fixed in cold 70% ethanol, stored at -20°C , washed in cold PBS, and treated with $10\ \mu\text{g/ml}$ of RNase during 1 h at 37°C . After staining with $50\ \mu\text{g/ml}$ of propidium iodide during 2 h at 4°C , the distribution of cells in the cell cycle was analyzed by flow cytometry.

Total protein and melanin extractions. For protein lysate preparation B16-F10 cells were scraped and lysed in a buffer containing 10% sucrose, 1% NP-40, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), $10\ \mu\text{g/ml}$ soybean trypsin inhibitor, $1\ \mu\text{g/ml}$ leupeptin and $1\ \mu\text{g/ml}$ aprotinin. Protein lysates were placed on ice for 30 min, vortexed every 10 min, and cleared by centrifugation at $12,000\ \text{xg}$ for 15 min at 4°C . The supernatants were retrieved and frozen at -80°C until use. The protein concentrations were determined using the Bradford method (49). Melanin extractions were performed according to Ando et al. (37). Briefly, cell pellets were centrifuged at $1,000\ \text{xg}$ for 5 min and washed twice with PBS. After further centrifugation, supernatants were discarded and precipitated cells resuspended in $200\ \mu\text{l}$ of distilled water, followed by the addition of 1 ml of ethanol-ether 1:1 (vol/vol). After 15 min the mixture was centrifuged as described above and the precipitate solubilized in 1 ml of 1 M NaOH/10% DMSO at 80°C for 30 min. The absorbance of the melanin solutions was measured at 470 nm in a spectrophotometer (Spectronic Genesys 2, Rochester, NY, USA).

Western blotting. Forty micrograms of each protein lysate were resolved on SDS-polyacrylamide gels, transferred onto nitrocellulose membranes (Protran, Schleicher &

Schuell, Keene, NH, USA) and stained with Ponceau S (Sigma) to verify the transfer efficiency and equal sample loading. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-HCl pH 7.6 containing 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20 (TBST) and probed for 2 h at room temperature with antibodies against p27^{Kip1} (1:1000 - Transduction Laboratories), Skp2 (1:..... - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), or anti-beta actin (AC-15) (1:40,000 - Sigma). Membranes were washed in TBST and then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies diluted at 1:1,000, washed again and the reactions developed with an enhanced chemiluminescence detection system (ECL detection kit, Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA) according to manufacturer's instructions. Membranes were exposed to high performance chemiluminescence films (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Melanoma model for spontaneous metastasis. B16-F10 mouse melanoma cells are capable to promote both experimental or spontaneous metastasis in C57BL/6 mice (50). Cells were grown until 60-70% confluence in RPMI 10% FBS, trypsinized, resuspended in PBS and injected (25×10^4 cells) in the peritoneal cavity of C57BL/6 mice with 8-9 weeks of age. Forty eight hours after cell inoculations, the animals started to be treated with daily IP injections of Orlistat (240 mg/kg) or the equivalent amount of vehicle (33% ethanol). After 12-15 days from the cell injections, mice were sacrificed by cervical dislocation, carefully dissected and the metastatic mediastinal lymph nodes counted. Samples of the primary tumors were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. The lungs, liver, thymus, brain, as well as the primary tumors and metastatic lymph nodes of each animal were embedded in paraffin, cut (3 μ m) and mounted on silane-coated glass slides for hematoxylin and eosin (H&E) staining. The intensities of the melanin pigmentation in the metastatic mediastinal lymph nodes as well as of the Oil Red O staining in the primary tumors were classified as negative, weak or strong in a blinded analysis performed by two of the authors (MAC and EG). This experiment was made three times independently.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants (04/13903-0 and 02/08030-1). MAC, FS and ALCAR were supported by FAPESP fellowships (05/52631-8, 05/50297-3 and 04/13904-6). DCB and KGZ were supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico fellowships (PIBIC-CNPq and 151125/2005-8).

1. Kuhajda, F. P. (2000) *Nutrition* **16**, 202-8.
2. Weiss, L., Hoffmann, G. E., Schreiber, R., Andres, H., Fuchs, E., Korber, E. & Kolb, H. J. (1986) *Biol Chem Hoppe Seyler* **367**, 905-12.
3. Pizer, E. S., Wood, F. D., Heine, H. S., Romantsev, F. E., Pasternack, G. R. & Kuhajda, F. P. (1996) *Cancer Res* **56**, 1189-93.
4. Gansler, T. S., Hardman, W., 3rd, Hunt, D. A., Schaffel, S. & Hennigar, R. A. (1997) *Hum Pathol* **28**, 686-92.
5. Alo, P. L., Visca, P., Marci, A., Mangoni, A., Botti, C. & Di Tondo, U. (1996) *Cancer* **77**, 474-82.
6. Krontiras, H., Roye, G. D., Beenken, S. E., Myers, R. B., Mayo, M. S., Peters, G. E. & Grizzle, W. E. (1999) *Head Neck* **21**, 325-9.
7. Piyathilake, C. J., Frost, A. R., Manne, U., Bell, W. C., Weiss, H., Heimbürger, D. C. & Grizzle, W. E. (2000) *Hum Pathol* **31**, 1068-73.
8. Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A. & Chinnaiyan, A. M. (2001) *Nature* **412**, 822-6.
9. Shurbaji, M. S., Kalbfleisch, J. H. & Thurmond, T. S. (1996) *Hum Pathol* **27**, 917-21.
10. Kusakabe, T., Nashimoto, A., Honma, K. & Suzuki, T. (2002) *Histopathology* **40**, 71-9.
11. Swinnen, J. V., Roskams, T., Joniau, S., Van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., Heyns, W. & Verhoeven, G. (2002) *Int J Cancer* **98**, 19-22.
12. Innocenzi, D., Alo, P. L., Balzani, A., Sebastiani, V., Silipo, V., La Torre, G., Ricciardi, G., Bosman, C. & Calvieri, S. (2003) *J Cutan Pathol* **30**, 23-8.
13. Rossi, S., Graner, E., Febbo, P., Weinstein, L., Bhattacharya, N., Onody, T., Buble, G., Balk, S. & Loda, M. (2003) *Mol Cancer Res* **1**, 707-15.
14. Visca, P., Sebastiani, V., Pizer, E. S., Botti, C., De Carli, P., Filippi, S., Monaco, S. & Alo, P. L. (2003) *Anticancer Res* **23**, 335-9.
15. Takahiro, T., Shinichi, K. & Toshimitsu, S. (2003) *Clin Cancer Res* **9**, 2204-12.
16. Rossi, S., Ou, W., Tang, D., Bhattacharya, N., Dei Tos, A., Fletcher, J. & Loda, M. (2006) *J Pathol*.
17. Furuya, Y., Akimoto, S., Yasuda, K. & Ito, H. (1997) *Anticancer Res* **17**, 4589-93.
18. Pizer, E. S., Chrest, F. J., DiGiuseppe, J. A. & Han, W. F. (1998) *Cancer Res* **58**, 4611-5.
19. Li, J. N., Gorospe, M., Chrest, F. J., Kumaravel, T. S., Evans, M. K., Han, W. F. & Pizer, E. S. (2001) *Cancer Res* **61**, 1493-9.

20. Zhou, W., Simpson, P. J., McFadden, J. M., Townsend, C. A., Medghalchi, S. M., Vadlamudi, A., Pinn, M. L., Ronnett, G. V. & Kuhajda, F. P. (2003) *Cancer Res* **63**, 7330-7.
21. Pizer, E. S., Pflug, B. R., Bova, G. S., Han, W. F., Udan, M. S. & Nelson, J. B. (2001) *Prostate* **47**, 102-10.
22. Pizer, E. S., Thupari, J., Han, W. F., Pinn, M. L., Chrest, F. J., Frehywot, G. L., Townsend, C. A. & Kuhajda, F. P. (2000) *Cancer Res* **60**, 213-8.
23. Alli, P. M., Pinn, M. L., Jaffee, E. M., McFadden, J. M. & Kuhajda, F. P. (2004) *Oncogene*.
24. Kridel, S. J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N. & Smith, J. W. (2004) *Cancer Res* **64**, 2070-5.
25. Menendez, J. A., Vellon, L. & Lupu, R. (2005) *Exp Biol Med (Maywood)* **230**, 151-4.
26. Menendez, J. A., Vellon, L. & Lupu, R. (2005) *Ann Oncol* **16**, 1253-67.
27. Knowles, L. M., Axelrod, F., Browne, C. D. & Smith, J. W. (2004) *J Biol Chem* **279**, 30540-5.
28. Lacasa, D., Le Liepvre, X., Ferre, P. & Dugail, I. (2001) *J Biol Chem* **276**, 11512-6.
29. Swinnen, J. V., Esquenet, M., Goossens, K., Heyns, W. & Verhoeven, G. (1997) *Cancer Res* **57**, 1086-90.
30. Swinnen, J. V., Heemers, H., Deboel, L., Fougelle, F., Heyns, W. & Verhoeven, G. (2000) *Oncogene* **19**, 5173-81.
31. Heemers, H., Maes, B., Fougelle, F., Heyns, W., Verhoeven, G. & Swinnen, J. V. (2001) *Mol Endocrinol* **15**, 1817-28.
32. Van de Sande, T., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G. & Swinnen, J. V. (2002) *Cancer Res* **62**, 642-6.
33. Graner, E., Tang, D., Rossi, S., Baron, A., Migita, T., Weinstein, L. J., Lechpammer, M., Huesken, D., Zimmermann, J., Signoretti, S. & Loda, M. (2004) *Cancer Cell* **5**, 253-61.
34. Ries L, E. M., Kosary C, et al. (2003) *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000. In: Bethesda, MD: National Cancer Institute.*
35. Kapur, P., Rakheja, D., Roy, L. C. & Hoang, M. P. (2005) *Mod Pathol* **18**, 1107-12.
36. Swinnen, J. V., Van Veldhoven, P. P., Esquenet, M., Heyns, W. & Verhoeven, G. (1996) *Endocrinology* **137**, 4468-74.
37. Ando, H., Funasaka, Y., Oka, M., Ohashi, A., Furumura, M., Matsunaga, J., Matsunaga, N., Hearing, V. J. & Ichihashi, M. (1999) *J Lipid Res* **40**, 1312-6.
38. Ando, H., Watabe, H., Valencia, J. C., Yasumoto, K., Furumura, M., Funasaka, Y., Oka, M., Ichihashi, M. & Hearing, V. J. (2004) *J Biol Chem* **279**, 15427-33.
39. McNeely, W. & Benfield, P. (1998) *Drugs* **56**, 241-9; discussion 250.
40. Chirala, S. S., Chang, H., Matzuk, M., Abu-Elheiga, L., Mao, J., Mahon, K., Finegold, M. & Wakil, S. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6358-63.
41. Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. & Golub, T. R. (2003) *Nat Genet* **33**, 49-54.

42. Swinnen, J. V., Van Veldhoven, P. P., Timmermans, L., De Schrijver, E., Brusselmans, K., Vanderhoydonc, F., Van de Sande, T., Heemers, H., Heyns, W. & Verhoeven, G. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 898-903.
43. Poste, G., Doll, J., Hart, I. R. & Fidler, I. J. (1980) *Cancer Res* **40**, 1636-44.
44. Fidler, I. J. (1973) *Nat New Biol* **242**, 148-9.
45. Chan, W. S., Page, C. M., Maclellan, J. R. & Turner, G. A. (1988) *Clin Exp Metastasis* **6**, 233-44.
46. Kawada, K., Sonoshita, M., Sakashita, H., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., Manabe, T., Inaba, K., Minato, N., Oshima, M. & Taketo, M. M. (2004) *Cancer Res* **64**, 4010-7.
47. Ito, D., Back, T. C., Shakhov, A. N., Wiltrout, R. H. & Nedospasov, S. A. (1999) *J Immunol* **163**, 2809-15.
48. Vantyghem, S. A., Postenka, C. O. & Chambers, A. F. (2003) *Cancer Res* **63**, 4763-5.
49. Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem* **72**, 248-54.
50. Khanna, C. & Hunter, K. (2005) *Carcinogenesis* **26**, 513-23.

Figure legends

Fig. 1. FAS activity is necessary for B16-F10 cell growth. (A) Immunofluorescence reactions for the FAS protein showing an intense and homogeneously distributed intracytoplasmic positivity in B16-F10 melanoma cells. (B) Negative control (nuclei were stained in blue with DAPI; original magnification: 200x). (C) The specific inhibition of FAS activity with 5 μ g/ml of cerulenin strongly reduced the proliferation of B16-F10 cells cultured in standard conditions (10% of FBS) (-▲-) in comparison with the respective DMSO controls (-■-). (D) Orlistat at 250 μ M (-▲-) significantly inhibited the growth of B16-F10 cells in medium supplemented with 2% of FBS in comparison with the ethanol controls (-□-). At 100 μ M Orlistat did not affect B16-F10 cell proliferation at least before 96 hours (-■-) (* $p < 0.001$, Mann-Whitney test). (E) Cell cycle analysis by flow cytometry showed that the incubation of B16-F10 cells with Orlistat for 36 h enhances the G0-G1 population and dramatically reduces the number of cells in the S phase (■ = G0/G1, □ = S, ▣ = G2/M). (F) Representative annexin V experiment showing that the treatment of B16-F10 cells with Orlistat for 20 h induces apoptotic cell death, especially at 500 μ M (C: control).

Fig. 2. FAS inhibition by Orlistat reduced both the cell growth and the melanin content of B16-F10 cells. (A-E) Melanoma cells exposed to 100 (B) and 250 (C) μ M of Orlistat showed scarce cytoplasm and long cell projections in comparison with the control cells (A). In the presence of 500 (D) and 750 (E) μ M of the drug cells became fusiform (H&E staining; original magnification: 200x). (F) Cells were cultured in the presence of 100-750 μ M of Orlistat during 48 hours and harvested by trypsinization. Cell pellets (1.1×10^6 cells) were almost completely discolored at 500 and 750 μ M of Orlistat (the cell pellet obtained from the 750 μ M condition contains less than 1.1×10^6 cells due to the cytotoxic effect of the drug). (G) Melanin was extracted from the cell pellets shown in (F) and its relative amount graphically represented. (H) The number of cells was determined by automatic cell counting before melanin extractions. Note that 100 and 250 μ M of Orlistat

inhibited B16-F10 cell growth whereas 500 and 750 μ M were cytotoxic since the number of cells counted after Orlistat treatment was lower than the number of cells in the beginning of the experiment (3.5×10^5 cells).

Fig. 3. Intraperitoneal primary tumors metastasized to mediastinal lymph nodes and to lungs of one control animal. Primary tumors of control mice were generally found at the side of cell injections and consisted of a soft and relatively circumscribed mass (*A*). (*B*) Primary tumors observed in Orlistat-treated group had many small groups of non-invasive tumor cells spread into the peritoneal cavity (*B* and *D*). (*C*) Metastatic mediastinal lymph nodes (LN) were easily identified due to their black color next to the thymus (T). (*E*) Gross appearance of the melanoma metastasis found in the left lung of one mouse of the control group. (*F* and *G*) Representative experiment showing the dissected lymph nodes and thymus; control mice (*F*) had more than twice ($n=19$) metastatic lymph nodes than Orlistat-treated group (*G*) ($n=9$), in which one animal did not present metastasis.

Fig. 4. Microscopic findings of the liver, primary tumors, and lymph node or lung metastasis. (*A*) Representative Oil Red O staining in a frozen section from the liver of a control animal, showing a large number of lipid droplets in the cytoplasm of the hepatocytes, in contrast with the almost completely negative section from an Orlistat-treated mouse (*B*). Control (*C*) and Orlistat-treated primary tumors (*D*) were histologically similar and characterized by anaplastic melanoma cells rich in melanin (arrowheads), calibrous blood vessels and several areas of necrosis (N). Adipose cells were a common finding mainly in the control primary tumors. Frozen sections from the primary tumors were stained with Oil Red O, which strongly labeled adipose cells dispersed in the control primary tumors (*E*). Tumor cells from both groups and adipose cells (arrow) from Orlistat-treated mice were weakly stained (*F*). (*G*) Representative metastatic lymph node infiltrated in its periphery by heavily pigmented melanoma cells (arrowheads). (*H*) Microscopic confirmation of the lung metastasis depicted in Figure 3*E*. Note the presence of melanoma cells around the bronchiole as well as nodular mass of tumor cells in the pulmonary

parenchyma (arrows). (*A*, *B*, *E*, and *F*: original magnification 200x, Oil Red O staining; *C*, *D*, *G*, and *H*: original magnification 100x, H&E staining).

Figure 1.

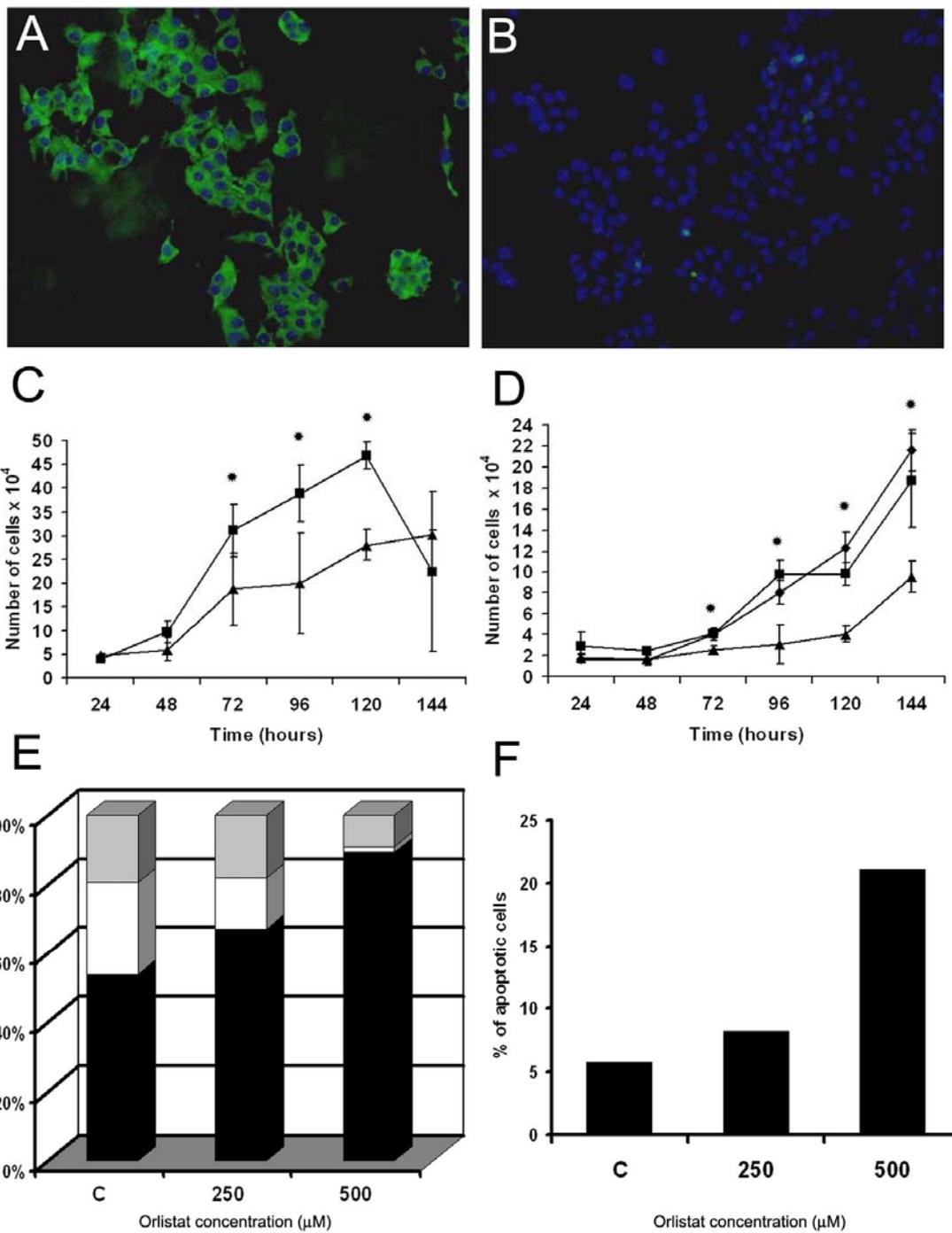


Figure 2.

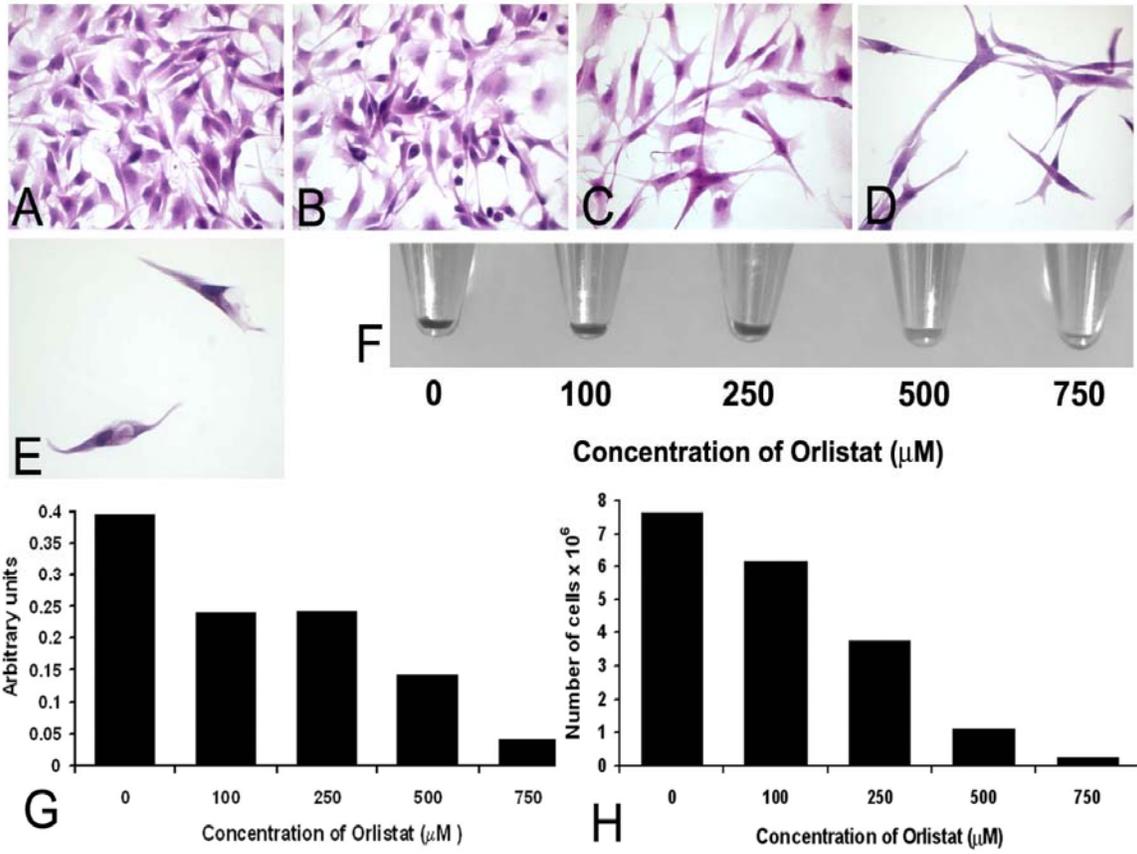


Figure 3.

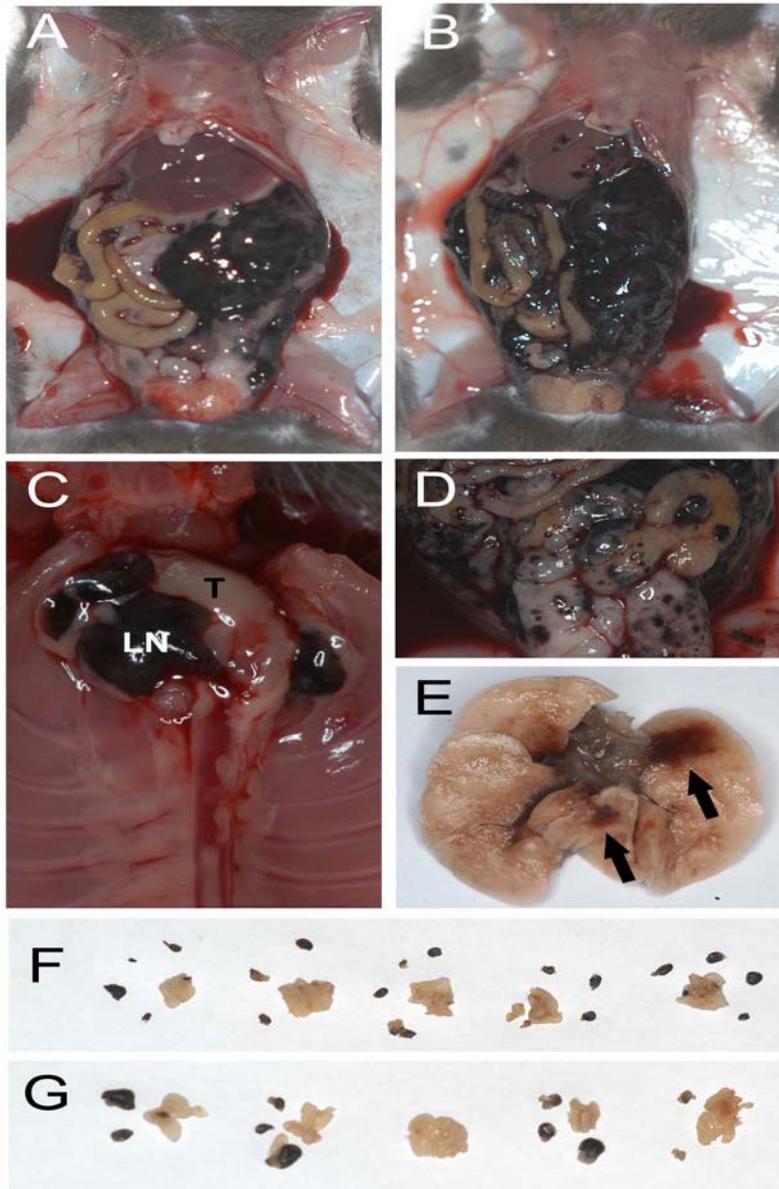


Figure 4.

