



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



FABIANA SEGUIN
Cirurgiã-dentista

***ESTUDO DO PAPEL BIOLÓGICO DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO
SINTASE (FASN) NA ANGIOGÊNESE INDUZIDA POR
MELANOMA MURINO***

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

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

**PIRACICABA
2009**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



FABIANA SEGUIN
Cirurgiã-dentista

**ESTUDO DO PAPEL BIOLÓGICO DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO
SINTASE (FASN) NA ANGIOGÊNESE INDUZIDA POR
MELANOMA MURINO**

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

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

**PIRACICABA
2009**

Este exemplar foi devidamente corrigido.
Refere-se a versão final da dissertação/tese
do aluno. CPG/FOP 14/03/2003

Handwritten signature of Edgard Graner, followed by a dotted line and the text "Assinatura do Orientador".

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Se39e	<p>Seguin, Fabiana. Estudo do papel biológico da enzima ácido graxo sintase (FASN) na angiogênese induzida por melanoma murino. / Fabiana Seguin. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Edgard Graner. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Câncer. I. Graner, Edgard. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Study of the fatty acid synthases (FASN) a activity in the angiogenesis induced by murine melanoma

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

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Edgard Graner, Ana Lúcia Carrinho Aryroza Rangel, Pablo

Agustin Vargas

Data da Defesa: 31-07-2009

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 31 de Julho de 2009, considerou a candidata FABIANA SEGUIN aprovada.

Edgard Graner

Prof. Dr. EDGARD GRANER

A. M. Carrinho

Profa. Dra. ANA LÚCIA CARRINHO AYROZA RANGEL

Pablo Agustin Vargas

Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Maria Luísa** e **Antônio Carlos**, pelo incentivo, pelo respeito em minhas decisões e principalmente por tornarem tudo possível.*

*Ao meu irmão, **Felipe**, meu grande amigo, pelo carinho, incentivo e cumplicidade.*

*À minha filha **Luísa**, mesmo em sua inocência, é a razão pela qual todos os meus dias são mais felizes.*

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

*Ao meu marido, **Greison** pela confiança, pelo exemplo de determinação e por todo amor dedicado à nossa família.*

*Ao meu orientador, **Professor Dr. Edgard Graner**, pela confiança, dedicação e incentivo. Agradeço toda tranquilidade e paciência que conduziu este trabalho e o considero um exemplo de simplicidade e carinho pela profissão, registro todo meu respeito e admiração.*

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

À **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado;

Às Prof^{as} Dr^{as}. **Ana Lúcia Rangel e Michelle Agostini** pela amizade, paciência e humildade com que me ensinaram desde minha iniciação científica as técnicas laboratoriais. E principalmente pelo exemplo de dedicação e carinho ao trabalho.

À Prof^a Dr^a. **Karina Gottardelo Zecchin**, pelas sempre valiosas sugestões e disponibilidade com que auxiliou e desempenhou neste trabalho.

Ao **Marco Antônio** pela amizade, atenção e ensinamento com que contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos de faculdade **Ana Cláudia, Débora C. Bastos, Débora Suzigan, Luís Henrique** e **Paulinha** pela amizade, carinho e momentos alegres que dividimos durante o período da graduação. Em especial à **Débora Bastos**, pela contribuição e companherismo durante a realização deste trabalho e principalmente pela amizade verdadeira.

Aos amigos do mestrado, **Andréia, Bruno, Renato, Patrícia, Daniel** e **Victor** pela troca de conhecimentos, agradáveis momentos de estudo e pela amizade que conquistamos. Em especial à **Andréia** pela grande colaboração durante os experimentos no laboratório.

Às amigas do laboratório **Lays, Carol, Rose** e **Sibele** pelo auxílio, pela troca de experiências e pelo agradável ambiente de trabalho e principalmente pela amizade.

Aos amigos da pós-graduação **Ana Teresinha, Adriele, Alan, Ana Lúcia, Camila, Carol, Fernanda Basso, Fernanda Mariano, Jorge, Lília, Lívia, Mário, Michele Kellermann, Marco Aurélio, Renato, Katya, Marisol, Rogério** e **Wilfredo** pelos momentos de estudo e diversão compartilhados;

À Sras. **Valéria** e **Ana**, pela amizade e ensinamentos das técnicas histológicas, necessárias para realização deste trabalho;

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

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

EPÍGRAFE

“O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para qual nos movemos”.

Oliver W. Holmes

A enzima ácido graxo sintase (FASN), cuja expressão e atividade estão elevadas em várias neoplasias malignas humanas, é responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa e conseqüentemente para a síntese de fosfolípídios de membrana. A inibição de FASN por orlistat (Xenical), uma droga anti-obesidade, é descrita como tendo propriedades anti-neoplásicas no câncer de próstata e mama e no melanoma, além de desempenhar um provável papel anti-angiogênico, uma vez que também inibe a proliferação de células endoteliais e a neovascularização em ensaio *ex vivo*. Em trabalho recente realizado por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que o tratamento de camundongos portadores de melanomas intraperitoneais com orlistat reduziu em cerca de 50% o número de metástases para linfonodos mediastínicos. Em outro estudo, também realizado por nosso grupo, foi observado que a inibição da atividade de FASN pode ter um papel sobre a linfangiogênese induzida por melanomas experimentais, pois a densidade de vasos linfáticos ao redor destes tumores foi significativamente aumentada pelo tratamento com orlistat. Considerando o papel biológico aparentemente relevante da FASN na disseminação metastática de melanomas, o presente trabalho teve como objetivo principal investigar, em ensaio *in vivo*, o papel desta enzima no processo de angiogênese induzida por implantes intradérmicos de células de melanoma (B16F10) em camundongos (C57Bl6). Através de um microscópio de dissecação e da obtenção de imagens dos vasos sanguíneos peritumorais, a rede vascular foi avaliada com o auxílio do programa Scion Image. Foi observado que a densidade de vasos sanguíneos ao redor dos tumores tratados com orlistat foi significativamente reduzida em relação aos grupos controle ($p=0,024$; teste de Mann-Whitney). Além disso, os tumores foram medidos e seus volumes calculados, verificamos que o tratamento com orlistat não alterou significativamente o seu crescimento. Através de reações de RT-PCR semi-quantitativo em amostras de RNA total extraído dos tumores, foi observado que a

expressão dos mensageiros de FASN não foi alterada pelo tratamento com orlistat. Por outro lado, houve aumento da quantidade dos mensageiros para VEGFA nos tumores dos grupos tratados com orlistat. Através da construção de curvas de proliferação e de experimentos de citometria de fluxo, foram avaliados os efeitos do tratamento da linhagem celular derivada de endotélio de aorta de coelho (RAEC) com cerulenina e orlistat. A adição de cerulenina (0,70 µg/ml) e orlistat (100 µM) ao meio de cultura das células RAEC provocou significativa inibição do crescimento celular, em comparação com as células controle. Finalmente, a incubação das células RAEC com meio previamente condicionado pelas células de melanoma B16F10 provocou aumento na taxa de crescimento, confirmando o potencial angiogênico destas últimas. Em conjunto, estes achados sugerem que a inibição da atividade de FASN pode ter um papel na redução da angiogênese induzida por melanomas experimentais, sugerindo que o bloqueio de FASN possa ser um alvo em potencial para a terapia anti-angiogênica.

Palavras-chave: câncer / ácido graxo sintase / orlistat / melanoma / angiogênese

ABSTRACT

The metabolic enzyme fatty acid synthase (FASN) is overexpressed in many human malignancies, being responsible for the endogenous synthesis of long-chain saturated fatty acids and consequently for the production of cell membrane phospholipids. Inhibition of FASN by orlistat (Xenical), an anti-obesity drug, has anti-neoplastic properties in prostate and breast cancer as well as in melanoma. In addition, FASN seems to participate in angiogenesis, since its blockage inhibits the proliferation of endothelial cells and neovascularization in an *ex vivo* assay. In a recent study conducted by our group, it was demonstrated that the treatment of mice bearing melanoma with orlistat was able to reduce by 50% the number of metastases to the mediastinal lymph nodes. We also observed that the inhibition of FASN activity may have a role in the melanoma-induced lymphangiogenesis, since the extension of lymphatic vessels around the tumors was significantly increased by the treatment with orlistat. Considering that the biological role of FASN is relevant in the metastatic spread of melanoma, the main goal of this study was to investigate the role of this enzyme in the angiogenesis process induced by intradermal implantation of melanoma cells (B16F10) in mice (C57Bl6). By using a microscope for dissection, we analyzed the images of the peritumoral blood vessels and the vascular network with the aid the Scion Image software. The blood vessel density around the tumors mice treated with orlistat decreased in comparison with the control group. Moreover, the tumors were measured and their volumes calculated. And no statistically significant changes observed. The effect of orlistat or cerulenin on the proliferation of a cell line derived from the rabbit aorta endothelium (RAEC) was analyzed by the construction of growth curves and flow cytometry. The addition of cerulenin (0.70 µg/ml) or orlistat (100 µM) to the culture medium of RAEC cells caused significant inhibition of cell growth compared with the non-treated cells. Taken together, these findings suggest that inhibition of FASN activity may have a role in the reduction of angiogenesis induced by

experimental melanomas, suggesting that FASN could be a potential target for the anti-angiogenic therapy.

Key words: cancer / fatty acid synthase / orlistat / melanoma / angiogenesis

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA: DNA complementar

DTT: Ditionietol

DMSO: Di-metil sulfóxido

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

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

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

FASN: *Fatty acid synthase* - Ácido graxo sintase

FBS: *Fetal Bovine Serum* - Soro fetal bovino

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

HE: Hematoxilina e eosina

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

IL: Interleucina

kDa: *Kilodalton*- Quilodaltons

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

MMP: Metaloproteinases da matriz

mRNA: RNA mensageiro

PA: *Plasminogen Activator* - Ativador de plasminogênio

pb: Pares de bases

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

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

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

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

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

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride* - Fenilmetilsulfonil fluoreto

RNAi: RNA de interferência

RT-PCR: *Reverse transcriptase-PCR*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulphate* - Dodecil Sulfato de Sódio

SREBP: *Sterol regulatory element binding proteins*- Proteínas ligantes da região regulada por proteínas

STI: *Soybean Trypsin Inhibitor* - Inibidor de tripsina

TNF: *Tumor necrosis factor*- Fator de necrose tumoral

UV: Ultravioleta

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR: *Vascular endothelial growth factor receptor*- Receptor de Fator de crescimento endothelial vascular

VHL: Von Hippel Lindau

xg: Força centrífuga

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Ácido graxo sintase (FASN)	5
2.1.1. Regulação da expressão de FASN	7
2.2. Inibidores específicos de FASN	9
2.3. Efeitos biológicos da inibição da expressão ou atividade de FASN	12
2.4. Angiogênese	13
2.5. Angiogênese tumoral	15
2.6. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	17
2.7. Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA)	18
2.8. Melanoma e VEGFA	19
2.9. Atividade de FASN e VEGF	21
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Cultura de células	25
4.2. Preparo das soluções de orlistat	26
4.3. Análise da proliferação celular e do ciclo celular	26
4.4. Ensaio de proliferação de células endoteliais em meio condicionado	27
4.5. Modelo animal para estudo da angiogênese	28
4.6. Purificação de RNA e RT-PCR semi-quantitativo	29
4.7. Análise Estatística	31

5. RESULTADOS	
5.1. Estudo piloto para avaliação da angiogênese induzida pelo implante intradérmico de células B16F10	33
5.2. Avaliação do efeito do orlistat sobre a angiogênese induzida por melanomas experimentais em camundongos C57BL6	35
5.3. Efeito da inibição de FASN com orlistat sobre o volume dos melanomas experimentais	40
5.4. Detecção de RNAs mensageiros para VEGFA através de RT-PCR semi-quantitativo	42
5.5. Efeitos da inibição da atividade de FASN com orlistat ou cerulenina sobre a proliferação de células endoteliais derivadas da aorta de coelho (RAEC)	50
5.6. Efeito de produtos secretados pelas células de melanoma B16F10 sobre a proliferação das células endoteliais em cultura	55
5.7. Avaliação do efeito do orlistat sobre o ciclo celular das células RAEC	
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	
ANEXO I: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa animal	98

1. INTRODUÇÃO

A angiogênese é um processo essencial durante o crescimento normal dos tecidos e a cicatrização, sendo caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes ou pelo recrutamento de células progenitoras endoteliais da medula óssea (Carmeliet *et al.*, 2001). Novos vasos sanguíneos são essenciais em tecidos isquêmicos como os de neoplasias malignas. Nestas, as células neoplásicas liberam fatores específicos que promovem a proliferação e a migração de células endoteliais. A neovascularização tem um duplo efeito sobre os tumores: ao mesmo tempo que a perfusão fornece nutrientes e oxigênio, a neoformação vascular propicia acesso das células neoplásicas a outros tecidos distantes, promovendo o crescimento tumoral continuado e a geração de metástases. A formação de novos vasos sanguíneos é freqüente nos melanomas, sendo esta neoplasia maligna caracterizada por um comportamento clínico agressivo devido a alta ocorrência de metástases à distância e resistência a agentes quimioterápicos (Dankort *et al.*, 2009). Durante o processo de angiogênese ocorre a interação entre muitos fatores rigorosamente regulados que a induzem ou reprimem. Por exemplo, é determinante o equilíbrio entre fatores pró-angiogênicos, como FGF-2 e VEGF, e anti-angiogênicos, como trombospondina-1, assim como a interação dos fatores com receptores presentes nas células endoteliais (Folkman *et al.*, 2003). A família VEGF é composta por 7 membros (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e PlGF) com diferentes propriedades biológicas. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-E, VEGF-F e PlGF têm grande importância no processo de angiogênese e vasculogênese, sendo que VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D estão ligados aos processos de linfangiogênese (Padera *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2002; Karkkainen, 2004).

A ácido graxo sintase (FASN) é uma enzima metabólica estruturalmente arranjada como um homodímero (massa molecular aproximada de cada cadeia de 250 kDa) responsável pela síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa, a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA. Sua expressão é baixa em tecidos normais e alta em várias neoplasias malignas humanas. A função de FASN parece estar relacionada com um pior prognóstico para alguns tipos de

tumores, sugerindo que sua atividade gere vantagens para a sobrevivência de células malignas como ocorre no melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2008). Acredita-se que nas células malignas, a atividade de FASN seja necessária para que ocorra a produção dos fosfolípidios que compõem as membranas celulares. Inibidores específicos da atividade de FASN, como cerulenina e seu análogo sintético C75, bloqueiam a síntese de DNA e causam apoptose em linhagens celulares derivadas de diferentes tumores malignos (Kuhajda *et al.*, 2000, Alli *et al.*, 2005). Os mecanismos biológicos que governam as interações entre a atividade lipogênica e moléculas que controlam o ciclo celular ainda não são conhecidos. A produção de FASN é regulada por ErbB2 tanto nos processos de transcrição, tradução quanto na sua atividade biossintética e a expressão de FASN e ErbB2 está relacionada com a presença de HIF-1 α , uma proteína mitogênica que regula a expressão de vários genes, dentre os quais o que codifica o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Orlistat (Xenical), uma droga anti-obesidade aprovada pela *US Food and Drug Administration* (FDA), foi descrita como tendo propriedades anti-neoplásicas em câncer de próstata, mama e melanoma, devido à sua capacidade de bloquear especificamente a atividade de FASN. Em trabalho realizado por Carvalho *et al.*, 2008, o tratamento de camundongos portadores de melanomas intraperitoneais experimentais com orlistat reduziu em 50% o número de metástases espontâneas para os linfonodos mediastínicos. A inibição farmacológica de FASN por orlistat foi realizada por Browne *et al.* (2006) em células endoteliais e previniu a proliferação destas células, além de inibir a neovascularização em ensaio *ex vivo*, o que sugere um papel anti-angiogênico. Segundo estes autores, orlistat previne a expressão do receptor VEGFR-2 na superfície das células endoteliais, inibindo desta forma a proliferação.

Em estudo realizado por Menendez *et al.* (2005b), verificou-se que a inibição específica da atividade de FASN com C75 provocou um aumento dose-dependente da expressão de VEGF (acima de 500%) em células tumorais que apresentam expressão elevada de ErbB-2. Demonstraram também que o bloqueio da atividade de FASN ativou drasticamente a via MAPK e promoveu um acúmulo

proeminente de HIF-1 α nestas mesmas células. O aumento da expressão de VEGF, ativação de MAPK e aumento da expressão de HIF-1 α também foi observado quando o gene da FASN foi silenciado através de RNAi. Estes achados sugerem que a perturbação do metabolismo endógeno de ácidos graxos das células tumorais desencadeia uma situação que mimetiza a hipóxia, a qual recupera prontamente a cascata MAPK-HIF-1 α -VEGF dependente de ErbB-2.

Considerando os resultados experimentais descritos acima, o objetivo deste trabalho foi verificar se a inibição da atividade de FASN com orlistat interfere no processo de angiogênese induzida por células de melanoma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ácido graxo sintase (FASN)

Os ácidos graxos são precursores dos fosfolipídeos das membranas celulares e importantes substratos para o metabolismo energético. As células neoplásicas malignas são comumente dependentes de um elevado metabolismo endógeno de ácidos graxos. Devido ao seu alto índice de proliferação, necessitam da produção contínua de ácidos graxos para a síntese das membranas, para a liberação de energia através da β -oxidação lipídica e também para a realização de modificações protéicas pós-traducionais (Menendez *et al.*, 2007). A síntese de ácidos graxos envolve a interação das enzimas acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FASN). A ACC carboxila o acetil-CoA para formar o malonil-CoA, sendo ambos utilizados pela FASN durante a síntese do ácido graxo de cadeia longa palmitato. Na última década, diversos trabalhos têm demonstrado o importante papel de FASN na sobrevivência das células tumorais. A conformação estrutural de FASN é de um homodímero de cadeias polipeptídicas longas com massa molecular de aproximadamente 250-270 kDa. Cada polipeptídeo possui sete sítios catalíticos que estão distribuídos a partir da extremidade amino terminal em direção a carboxil terminal na seguinte ordem: β -cetoacil sintase (cataliza a condensação dos resíduos de malonil e acetil com a cadeia de ácido graxo em formação), acetil-CoA e malonil-CoA transacilases (são sítios de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para a subsequente reação de condensação), os sítios desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase e proteína carregadora de acil (atuam como redutores, sobre o produto formado pela β -cetoacil sintase), e por fim o sítio tioesterase localizado na região carboxil terminal (promove a hidrólise do palmitato) que atuam em sequência até a liberação da molécula de ácido graxo recém sintetizada (Wakil, 1989; Jayakumar *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2003).

A atividade de FASN é mínima em tecidos normais, exceto em tecidos lipogênicos, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos usados pelas células provém da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Menendez *et al.*, 2005a). Desta forma, a

expressão de FASN é baixa ou mesmo ausente na maioria dos tecidos humanos adultos normais (Weiss *et al.*, 1986), com exceção do fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e dos pulmões de recém nascidos onde ocorre a produção da substância surfactante (Kuhajda, 2000; Chirala *et al.*, 2001). Ao contrário, nas células de neoplasias malignas a maior parte dos ácidos graxos provém da síntese endógena, através da atividade de FASN. A expressão de FASN está aumentada em diversos tipos de neoplasias malignas humanas de natureza epitelial, como as mama (Wang *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Bershtein *et al.*, 2009), cólon (Visca *et al.*, 1999; Ogino *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2009; Kearney *et al.*, 2009; Uddin *et al.*, 2009), próstata (Epstein *et al.*, 1995; Swinnen *et al.*, 2000a; Swinnen *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003; Van de Sande *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2006), ovário (Alo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001a), endométrio (Pizer *et al.*, 1998b; Tsuji *et al.*, 2004), carcinoma de células renais (Horiguchi *et al.*, 2008), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Orita *et al.*, 2007; Orita *et al.*, 2008), bexiga (Visca *et al.*, 2003), mieloma múltiplo (Okawa *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008); gliomas (Zhao *et al.*, 2006); carcinomas espinocelulares bucais (CECs) (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008) e melanomas (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur, 2005a; Kapur, 2005b), além de sarcomas de tecidos moles (Rossi *et al.*, 2006). Em alguns destes tumores foram realizados estudos imunohistoquímicos que correlacionaram a alta expressão de FASN com uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e conseqüentemente pior prognóstico, como os de próstata (Epstein *et al.*, 1995), ovário (Gansler *et al.*, 1997), tireóide (Vlad *et al.*, 1999); cólon (Visca *et al.*, 1999; Ogino *et al.*, 2008, Uddin *et al.*, 2009), ovário (Alo *et al.*, 2000), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005b), sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003), carcinoma de células renais (Horiguchi *et al.*, 2008) e CECs bucais (Silva *et al.*, 2009). Além do mais, uma associação inversa entre alta expressão de FASN e redução do índice apoptótico foi observada em câncer de próstata (Migita *et al.*, 2009) e co-expressão de FASN com a proteína Caveolina-1 (Cav-1) foi relacionada ao pior prognóstico de pacientes com câncer

pancreático (Witkiewicz *et al.*, 2008). Em melanomas observou-se uma correlação positiva entre expressão de FASN e índice de Breslow, além de uma correlação inversa entre FASN e a sobrevida total (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005). Os dados disponíveis até o momento sugerem que a elevada atividade desta via anabólica gera vantagens para o rápido crescimento celular no câncer (Baron *et al.*, 2004).

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

2.1.1. Regulação da expressão de FASN

O aumento da síntese de ácidos graxos é causado por múltiplos mecanismos, incluindo a expressão aumentada de enzimas lipogênicas. A biosíntese endógena de ácidos graxos em tecidos normais como no fígado e tecido adiposo é catalizada pela FASN, sendo estimulada pela alta concentração de carboidratos e suprimida pela presença de ácidos graxos na dieta (Fukuda *et al.*, 1999).

Como descrito anteriormente, a expressão elevada de FASN é observada em uma ampla variedade de tumores malignos humanos. Embora os mecanismos

responsáveis por este fenômeno não sejam completamente entendidos, de uma maneira geral, a expressão de FASN é regulada por fatores de crescimento, hormônio esteróides, e seus respectivos receptores (revisado por Mashima *et al.*, 2009). Fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)-Akt e proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) são vias de sinalização que medeiam expressão de FASN através do fator de transcrição SREBP-1c. SREBPs são proteínas que estimulam a transcrição de FASN quando interagem com sequências específicas do DNA dentro do promotor de FASN (Swinnen *et al.*, 1997b; Swinnen *et al.*, 2000b; Heemers *et al.*, 2001). Está experimentalmente demonstrada a regulação mútua de FASN e do receptor do fator de crescimento ErbB2, o qual induz a expressão de FASN através da sinalização PI3K (Kumar-Sinha *et al.*, 2003), e por sua vez, também depende da expressão FASN (Menendez *et al.*, 2004). Esta regulação foi observada por Menendez *et al.* (2004) em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário, nas quais a inibição (farmacológica ou via RNAi) de FASN suprime a expressão de ErbB2 através da elevação da expressão de PEA3, um repressor da transcrição de ErbB2. Estes efeitos são complexos e envolvem a ativação de múltiplas vias de transdução de sinais, como por exemplo a via de PI3K–Akt (Van De Sande *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). Os fatores de crescimento e seus receptores também afetam a expressão de FASN em células tumorais através da via MAPK, que desencadeia uma cascata de sinais que culmina com a ativação do ciclo celular (Menendez *et al.*, 2005). Está demonstrado que a progesterona estimula a expressão desta enzima em linhagens celulares de câncer de mama (Lacasa *et al.*, 2001), enquanto que andrógenos aumentam a expressão e a atividade de FASN em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata (LNCaP) (Swinnen *et al.*, 1997a; Swinnen *et al.*, 2000a; Myers *et al.*, 2001; Heemers *et al.*, 2001). Os efeitos destes hormônios sobre a expressão de FASN também envolvem a ativação da via de transdução de sinais PI3K–Akt e ERK1/2 (revisado em Lupu & Menendez, 2006). Tanto a testosterona como o EGF são capazes de estimular a expressão gênica de FASN através das proteínas SREBPs, especialmente pela modulação de SREBP1c (Swinnen *et al.*, 1997).

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

2.2. Inibidores específicos de FASN

A inibição da enzima FASN como uma possível forma terapêutica para o câncer tem sido estudada em diversas linhagens celulares. Existem cinco inibidores da atividade de FASN: a cerulenina e seu análogo sintético c75, orlistat, triclosan e EGCG (*epigallocatechin-3-gallate*), um componente do chá-verde (Menendez *et al.*, 2007).

A cerulenina ([2R,3S]-2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida) é um produto natural do fungo “*cefalosporium caerulens*”, conhecida desde 1960 por possuir propriedades anti-fúngicas. É um inibidor da síntese de ácidos graxos por bloquear irreversivelmente a atividade de FASN (Omura, 1976; Pizer *et al.*, 1996) através de uma ligação covalente no sítio catalítico β -cetoacil sintase (responsável pela reação de condensação dos resíduos de acetil e malonil) (Kuhajda *et al.*, 2000). Por ser instável, a aplicação clínica da cerulenina é limitada. C75 é uma pequena molécula sintética com cadeia de 7 carbonos (α -metileno- γ -butirolactona) que possui efeitos inibitórios sobre a atividade da FASN comparáveis aos da

cerulenina, sendo mais estável do que esta última e apresentando, portanto, melhor efeito em experimentos *in vivo* (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

Tanto a cerulenina como o c75 causam significativa inibição da progressão do ciclo celular, bloqueando a passagem das fases G0/G1 para a fase S em linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas humanas (Pizer *et al.*, 1996; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998b; Kuhajda, 2000; Li *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003). A inibição da atividade de FASN causa ainda, em células malignas, um aumento na taxa de morte por apoptose (Li *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 2008). Menendez *et al.* (2004) demonstraram, num estudo com linhagens derivadas de câncer de mama e ovário, que a inibição de FASN com cerulenina ou c75 leva a uma diminuição da expressão da oncoproteína ErbB2. O tratamento com estes inibidores causa também a redução no tamanho de tumores em modelos xenográficos através da injeção de células derivadas de câncer de ovário humano (OVCAR-3) no peritônio de camundongos (Pizer *et al.*, 1998a). Os mesmos autores (Pizer *et al.*, 2000) relataram uma acentuada redução da síntese de ácidos graxos e do volume tumoral, além de aumento da taxa de apoptose, em camundongos que receberam implantes subcutâneos de células derivadas de câncer de mama (MCF7), após tratamento com c75. Gabrielson *et al.* (2001) demonstraram efeito semelhante em modelo xenográfico de mesotelioma, com células H-Meso. Alli *et al.* (2005) observaram que camundongos transgênicos *neu-N* têm expressão forçada de ErbB2 e desenvolvem câncer de mama de forma espontânea, apresentaram significativa diminuição no aparecimento dos tumores quando tratados com c75 (de 50% para 20%), o que sugere um efeito quimiopreventivo.

Orlistat (tetrahidrolipstatin, comercializado pela Roche como Xenical) é um derivado semi-sintético da lipstatina já aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA), para o tratamento da obesidade por inibir irreversivelmente a ação de lipases gástricas e pancreáticas (Guercioli *et al.*, 1997). Esta droga também é capaz de bloquear a função tioesterase da FASN, responsável pela liberação do palmitato (Kridel *et al.*, 2004) o que lhe proporciona efeito anti-proliferativo em células de câncer de mama e próstata e anti-tumoral em modelo

xenográfico de câncer de próstata (Menendez *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 2004). Browne *et al.* (2006) inibiram a atividade de FASN com orlistat em células endoteliais de vasos sanguíneos e observaram redução na proliferação, o que foi atribuído à inibição da expressão do receptor VEGFR-2 na superfície celular. Menendez *et al.* (2004, 2005c) demonstraram que o tratamento de células derivadas de carcinoma de mama (SK-Br3) e de estômago (NCI-N87) com orlistat causa, além da inibição da síntese de ácidos graxos, um bloqueio do ciclo celular nas fases G0/G1, além de aumentar o índice apoptótico. Menendez *et al.* (2004) mostraram que inibição de FASN com orlistat ou com RNAi diminui a expressão do receptor de superfície ErbB2 em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário, além de aumentar os níveis de p27^{Kip1}. Em recente estudo realizado por nosso grupo (Carvalho *et al.*, 2008), células B16F10 foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos C57Bl6 e resultaram no desenvolvimento de metástases espontâneas para os linfonodos mediastínicos em 100% dos casos. O tratamento destes animais com orlistat reduziu pela metade o número de linfonodos afetados e inibiu a proliferação das células de melanoma em cultura, com bloqueio da passagem para a fase S do ciclo celular.

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

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

primárias (Almeida *et al.*, 2005), sugerindo que a produção endógena de ácidos graxos não seja essencial somente para as células malignas.

2.3. Efeitos biológicos da inibição da expressão ou atividade de FASN

Embora os mecanismos através dos quais o bloqueio de FASN induz a morte celular em células neoplásicas ainda sejam desconhecidos, várias possibilidades têm sido propostas. Estudos preliminares indicam que a inibição de FASN provoca acúmulo do metabólito intermediário malonil-CoA, o qual induz apoptose pelo seu próprio efeito citotóxico e por bloquear a oxidação de ácidos graxos (Pizer *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Thupari *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003). Outros estudos sugerem que a falta de ácido graxo pode ser um fator crítico para a indução da apoptose. Chajes *et al.* (2006) observaram que durante o cultivo de células neoplásicas com expressão diminuída das enzimas Acetil-CoA carboxilase e FASN têm altos índices apoptóticos, o que não acontece quando ácido palmítico é acrescentado ao meio de cultura. Segundo Pizer *et al.* (1998a), o efeito citotóxico da inibição de FASN não se deve a uma ação direta no DNA ou na maquinaria de replicação e envolve a função de p53, o qual foi relacionado a perturbações na síntese de ácidos graxos (Li *et al.*, 2001). Entretanto, o efeito citotóxico decorrente do bloqueio de FASN pode ocorrer de maneira independente de p53, através da ativação direta de sinais apoptóticos como a alta expressão de Bax, liberação do citocromo C e ativação de caspases (Heiligtag *et al.*, 2002). Bandyopadhyay *et al.* (2006) inibiram a expressão de FASN através de RNAi em células de câncer de mama, o que levou a um acúmulo de malonil-CoA e consequente inibição da enzima de membrana mitocondrial CPT-1. Esta última é responsável pela transesterificação dos ácidos graxos de cadeia longa (na forma de acil-CoAs) em acil-carnitina, permitindo a entrada destes na mitocôndria para serem oxidados. Também foi verificado um aumento do lipídio ceramida, que está relacionado a respostas apoptóticas celulares mediadas por indutores de apoptose, como FAS/FAS ligante, TNF- α (fator de necrose tumoral α), fatores de crescimento, hipóxia e danos ao DNA. Foi observado ainda que a inibição de FASN promove aumento na expressão de genes pró-apoptóticos como BNIP3,

TRAIL (“*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*”) e DAPK2 (“*death-associated protein kinase 2*”). Estudos mostram que a perturbação na atividade enzimática de FASN induz estresse no retículo endoplasmático das células tumorais e estas respondem com a ativação do processo autofágico, estes achados sugerem uma relação entre a autofagia e a lipogênese tumoral (Little *et al.*, 2007; Buzzai *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2007).

Estudos recentes do nosso laboratório têm demonstrado que a inibição de FASN com orlistat ou cerulenina em células de melanoma murino B16F10 inibe a proliferação e induz morte por apoptose, com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3. A morte celular induzida por orlistat é precedida por estresse oxidativo (aumento de espécies reativas de oxigênio - EROs e [Ca²⁺]_{cit}) e é independente da participação de p53, calcineurina ou abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Zecchin *et al.*, dados não publicados). Como mencionado anteriormente, Browne *et al.* (2006) mostraram que orlistat suprime a proliferação das células endoteliais e a angiogênese. Finalmente, a expressão forçada de FASN confere resistência aos quimioterápicos adriamicina e mitoxantrona em células de câncer de mama (Liu *et al.*, 2008). Em conjunto, todas estas observações sugerem que a inibição de FASN poderia ser uma nova estratégia para interferir na sobrevivência tumoral, com possível participação de um efeito anti-angiogênico.

2.4. Angiogênese

Os vasos sanguíneos são originados durante o desenvolvimento embrionário através de um fenômeno conhecido como vasculogênese, no qual uma rede vascular primitiva é estabelecida a partir dos angioblastos (precursores das células endoteliais). Os angioblastos proliferam, migram e se diferenciam em células endoteliais, que então formam as artérias, as veias e os linfáticos (Evan *et al.*, 2001; Korsmeyer *et al.*, 1999). O processo de formação de vasos sanguíneos em tecidos adultos é conhecido como angiogênese ou neovascularização, no qual novos vasos são formados a partir da extensão e ramificação de vasos pré-existentes ou pelo recrutamento de células progenitoras endoteliais da medula

óssea (Carmeliet *et al.*, 2001). A angiogênese é essencial nos processos inflamatórios crônicos, cicatriciais, para a vascularização de tecidos isquêmicos e crescimento tumoral. Seu papel na patogênese de tumores malignos tem gerado muitos estudos nos últimos anos para compreender os mecanismos biológicos envolvidos, bem como os efeitos terapêuticos dos agentes anti-angiogênicos.

O controle molecular da angiogênese é complexo e tem um papel chave desempenhado pelo fator de crescimento vascular (VEGF) (Ferrara *et al.*, 2002). O crescimento dos vasos sanguíneos para responder às necessidades do tecido depende da produção e secreção de VEGF, que é estimulada pela falta de oxigênio. Na hipóxia ou em resposta a TGF- α , TGF- β e PDGF ocorre um aumento intracelular do chamado fator I induzido por hipoxia (HIF-1 α), que por sua vez estimula a transcrição do gene que codifica VEGFA, cujo produto protéico difunde-se pelos tecidos e atua sobre seus receptores presentes nas células endoteliais. Com o auxílio de proteases, como MMP-2, -3 e -9, as células endoteliais digerem seu caminho através da matriz extracelular, migram, proliferam sobre uma matriz provisória formada por proteínas plasmáticas formando tubos e, finalmente, diferenciam-se (Risau *et al.*, 1997; Yancopoulos *et al.*, 2000; Jain, 2003). Após o reestabelecimento da oxigenação, HIF-1 α torna-se indisponível através de sua contínua degradação proteossômica dependente do produto do gene *von Hippel-Lindau* (VHL) (Yancopoulos *et al.*, 2000). Como resultado, as células endoteliais se tornam quiescentes e os vasos permanecem ou regridem se não forem mais necessários.

Existe uma variedade de fatores indutores de angiogênese, os quais são divididos em três classes (Klagsbrun & Moses, 1999; Bergers & Benjamin, 2002). A primeira consiste na família do fator de crescimento epitelial vascular (VEGF) e das angiopietinas, os quais agem especificamente nas células endoteliais. A segunda classe inclui principalmente moléculas de ação direta, como citocinas, quimiocinas e enzimas angiogênicas que ativam diversas células alvo, além das endoteliais. Um importante membro deste grupo é o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2), um dos primeiros peptídeos angiogênicos a ser caracterizado (Moore *et al.*, 1998; Brown & Bicknell, 1998; Chiarugi *et al.*, 1998). O

terceiro grupo de moléculas angiogênicas tem ação indireta, que resulta na liberação de fatores de ação direta por macrófagos, células endoteliais e células tumorais, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o fator de crescimento transformante- β (TGF- β). *In vivo*, TGF- β induz angiogênese e estimula a expressão de TNF- α , FGF-2, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e VEGF por atrair células inflamatórias (Falcone et al., 1993; Pintavorn & Ballermann, 1997). TNF- α é capaz de aumentar a expressão de VEGF e de seus receptores, de IL-8 e de FGF-2 pelas células endoteliais, o que explica suas propriedades angiogênicas *in vivo* (Giraud et al., 1998; Yoshida et al., 1997).

2.5. Angiogênese tumoral

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

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

Os fatores angiogênicos VEGF e FGF são liberados pelo tumor, pelas células inflamatórias que infiltram os tumores (como os macrófagos) e pelo próprio estroma tumoral (Ferrara, 2003). As células do estroma podem contribuir com sinais positivos ou negativos para o desenvolvimento tumoral, além de contribuírem para que suas células resistam às terapias citotóxicas (Joyce, 2005, Sparmann & Bar-Sagi, 2004; Albini *et al.*, 2005; Karin, 2005). Albini & Sporn (2007) relataram, em trabalho de revisão que disfunções nas células do estroma durante os estágios precoces do crescimento do tumor, associadas às alterações que ocorrem nas células malignas propriamente ditas, são cruciais para a sobrevivência do tumor. Portanto, pode-se considerar o “microambiente” como parte integral de uma neoplasia, sendo formado por células endoteliais e seus precursores, pericitos, células musculares lisas, fibroblastos de fenótipos variados, miofibroblastos, neutrófilos e outros granulócitos (eosinófilos e basófilos), mastócitos, linfócitos T, B e “natural killer”, além de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. Os sistemas sanguíneos e linfáticos, bem como os componentes da matriz extracelular também fazem parte do microambiente tumoral.

Devido a importância da neoformação vascular no desenvolvimento tumoral, muitos estudos têm avaliado os mecanismos dos agentes anti-angiogênicos. O primeiro inibidor angiogênico descrito foi a trombospondina-1, que modula a proliferação de células endoteliais e sua mobilidade (Volpert *et al.*, 1995). Surpreendentemente, muitas moléculas inibitórias, tais como as “estatinas”, são derivadas de proteínas maiores que não têm efeito sobre a angiogênese. Entre elas estão a angiostatina (um fragmento do plasminogênio que liga a anexina II e a ATP sintase), endostatina, tumstatina e canstatina, os quais são fragmentos de colágenos que se ligam a integrinas (revisado por Kalluri *et al.*, 2002; O’Reilly *et al.*, 1997a; O’Reilly *et al.*, 1997b; Maeshima *et al.*, 2001; Kamphaus *et al.*, 2001). Outro grupo de inibidores é formado por drogas antagonistas ao VEGF ou VEGFR-2. Por exemplo, avastina é um anticorpo monoclonal que se liga ao VEGF impedindo que ele se acople ao seu receptor (VEGFR-2) (Kim *et al.*, 1992; Ferrara *et al.*, 2004), utilizado no tratamento de

pacientes com câncer de colon uterino metastático (*US Food and Drug Administration*, FDA, 2004). SUTENT (SU11248), uma pequena molécula antagonista do domínio quinase e VEGFR-2 (Mendel *et al.*, 2003) tem demonstrado eficácia em tumores metastáticos gastrointestinais (Demetri *et al.*, 2005) e em células de carcinoma metastático renal (Motzer *et al.*, 2005).

2.6. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Muitas moléculas têm sido implicadas como reguladores positivos da angiogênese, através da ativação de vários receptores (Folkman *et al.*, 1992; Yancopoulos *et al.*, 2000). Entretanto, a mais estudada é o VEGF, que promove o crescimento das células endoteliais derivadas de artérias, veias e linfáticos (Ferrara *et al.*, 1997). VEGF é um termo que engloba uma família de 7 membros formada por PLGF, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE e VEGFF. VEGFA é o principal regulador do crescimento dos vasos sanguíneos e VEGFC e VEGFD regulam a linfangiogênese (Karkkainen *et al.*, 2002). Além de ser mitógeno para células endoteliais, VEGFA também tem importante efeito sobre a permeabilidade vascular e quimiotaxia de células derivadas da medula óssea ou monócitos (Clauss *et al.*, 1990). Este fator se liga aos receptores VEGFR-1 ou VEGFR-2 e aos co-receptores neuropilinas 1 e 2 (NRP1 e NRP2), ao passo que VEGFC e VEGFD se ligam a VEGFR-3 no processo de linfangiogênese (Karkkainen *et al.*, 2002). Existem muitas evidências de que VEGFR-2 é o mais importante mediador da mitogênese e sobrevivência das células endoteliais, bem como da permeabilidade vascular durante a angiogênese. Em contraste, VEGFR-1 não medeia sinais mitogênicos e pode, especialmente durante o desenvolvimento embrionário, inibir a proliferação endotelial através do seqüestro de VEGFA, que por sua vez impede que este fator ligue-se ao VEGFR-2 (Ferrara *et al.*, 2003). VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos em células endoteliais vasculares e células tumorais e VEGFR-3 é aparentemente produzido apenas por células endoteliais linfáticas (Kowanetz e Ferrara, 2006). A expressão do VEGF-A é também estimulada por citocinas e fatores de crescimento (TGF- β , PDGF, TGF- α) e por hipóxia tecidual, mecanismo relativamente bem compreendido (Dvorak *et al.*, 1995).

2.7. Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA)

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGFA ou apenas VEGF) é um mitógeno específico para células endoteliais com papel central na angiogênese durante vários processos fisiológicos e patológicos, (Ferrara *et al.*, 2002), sendo o principal alvo da terapia anti-angiogênica contra o câncer (Catena *et al.*, 2007). O gene humano que codifica VEGF reside no cromossomo 6p21.3 e está organizado em 8 exons (Vincenti, *et al.*, 1996; Tisher *et al.*, 1991). Através do mecanismo de splicing alternativo, o gene *VEGFA* produz proteínas variantes com atividade pró-angiogênica como VEGF206, VEGF189, VEGF183, VEGF165, VEGF148, VEGF145, e VEGF121 (Ferrara *et al.*, 1997; Houck *et al.*, 1991) ou anti-angiogênicas como, VEGF189b, VEGF183b, VEGF165b, VEGF145b e VEGF121b (Woolard *et al.*, 2004). As isoformas correspondentes em camundongos, cujo gene reside no cromossomo 17, são VEGF205, VEGF188, VEGF182, VEGF164, VEGF147, VEGF144, e VEGF120. Os exons 1 a 5 e 8 estão preservados em todas as variantes, enquanto a utilização ou não dos exons 6a, 6b, e 7 produz as isoformas. Por exemplo, nas isoformas 121/120 faltam os exons 6 e 7 (Ferrara *et al.*, 1997), já os fatores 165/164 contêm o exon 7 e as formas 148/147 têm a mesma seqüência de aminoácidos de 165/164 menos 35 pares de base ao final do exon 7 (Whittle *et al.*, 1999). Os mensageiros de 189/188 possuem os exons 6 e 7 (Ferrara *et al.*, 1997) ao passo que de 183/182 perdem 18 pares de base do exon 6 (Lei *et al.*, 1998). Os fatores 145/144 contêm o exon 6a mas não o exon 7 (Poltorak *et al.*, 1997) e as variantes 206/205 são as mais extensas, contendo além de exons 6 e 7, mais 51 pares de base do intron 3 (Houck *et al.*, 1991). As isoformas de VEGF diferem na sua capacidade de interação com heparan sulfato e heparina na matriz extracelular, bem como na afinidade com seus receptores (Neufeld *et al.*, 1999). Entretanto, todas elas se ligam a VEGFR-1 (flt-1) e VEGFR-2 (KDR/Flk-1) (Waltenberger *et al.*, 1994; Carmeliet *et al.*, 1999), sendo a interação com o último reforçada por neuropilina-1 (NP-1) (Soker *et al.*, 1998).

A maioria das células produtoras de VEGF parecem expressar preferencialmente VEGF121, VEGF165 e VEGF189 (Ferrara *et al.*, 2002), dentre

as quais a mais estudadas são VEGF165 e VEGF165b, presentes tanto em tumores como em tecidos normais (Rennel *et al.*, 2008). VEGF121/120 é muito solúvel, pois não se liga a heparina, ao contrário de VEGF165/164 que quando secretada, se mantém ligada à superfície da célula ou à matriz extracelular (Park *et al.*, 1993). VEGF189/188, que mantém ambos os exons 6 e 7, tem maior afinidade à heparina e, portanto, permanece fortemente associada à superfície celular ou matriz extracelular. VEGF145 é uma das principais variantes produzidas por várias linhagens de células derivadas de carcinomas do aparelho reprodutor feminino (Poltorak *et al.*, 1997) e também tem sido detectada no ovário e em amostras dos tecidos da mama (Stimpfl *et al.*, 2002). VEGF148 foi identificado em glomérulos humanos (Whittle *et al.*, 1999), mas não há dados relativos da sua expressão em outros tecidos. VEGFA 189 é altamente expresso nos pulmões (Cheung *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 2001), enquanto que no coração há predominância da expressão de VEGFA 189 e 165 (Carmeliet *et al.*, 1999). VEGF206 é uma isoforma muito rara encontrada em uma biblioteca de fígado fetal humano (Neufeld *et al.*, 1999). Todas as 7 isoformas estão presentes no testículo de rato durante o décimo oitavo dia de desenvolvimento embrionário e 3 dias após o nascimento (Bott *et al.*, 2006), e a expressão de VEGFA 188, 164 e 120 durante o processo de reparo hepático de rato é variável (Kraizer *et al.*, 2001). As informações acima sugerem que a angiogênese fisiológica ou patológica depende do balanço da expressão das isoformas de VEGF.

2.8. Melanoma e VEGFA

O melanoma é uma neoplasia maligna conhecida pelo seu comportamento clínico agressivo, propensão para metástases e resistência ao tratamento quimioterápico. Os melanomas originam-se da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de pigmentos derivadas da crista neural que migram para a pele, retina e mucosas oronasal e respiratória durante o desenvolvimento (Quevedo & Fleischmann 1980). Assim como em outras neoplasias malignas, acredita-se que tanto fatores ambientais como genéticos contribuam para a etiologia do melanoma, sendo o grau de pigmentação da pele e

a radiação ultravioleta, fatores predisponentes ao seu desenvolvimento (revisado por Chin 2003).

De maneira geral, o melanoma representa cerca de 4% das neoplasias malignas de pele, sendo o terceiro tipo de câncer de pele mais comum, com incidência mundial anual de 24,6 casos para cada cem mil homens e 15,6 casos para cada cem mil mulheres. Estimativas do *National Cancer Institute* (www.cancer.gov) previram nos E.U.A. 68.720 novos casos, com 8.650 mortes em 2009. No Brasil, segundo dados do INCA, o melanoma representa a oitava neoplasia maligna mais freqüente em homens e nas mulheres, tendo sido estimados 5.920 novos casos para o ano de 2008 (INCA, 2008). 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 (1-2%), no entanto podem apresentar maior agressividade do que os da pele (revisado em Hicks & Flaitz 2000). No estágio inicial, o melanoma é efetivamente tratado por excisão cirúrgica, mas a doença metastática é na maioria das vezes fatal e apresenta a sobrevida média de 8 meses e de 2% em 5 anos (Lee *et al.*, 2000, Innocenzi *et al.*, 2003). Fatores associados à radiação UV, tais como grau de pigmentação da pele, índice de exposição à 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). Várias alterações genéticas têm sido identificadas, sendo a mais estudada a mutação pontual (T1799A) no proto-oncogene BRAF, que é detectada em aproximadamente 65% dos indivíduos afetados por esta neoplasia (Chin *et al.*, 1998; Gray-Schopfer *et al.*, 2005; Garraway *et al.*, 2005; Hayward *et al.*, 2003; Pollock *et al.*, 2003).

O VEGF tem expressão elevada na maioria dos tumores humanos (Ferrara *et al.*, 1997), incluindo o melanoma maligno (Potgens *et al.*, 1995; Rennel *et al.*, 2008), no entanto, a expressão de cada isoforma é variável. Por exemplo, em câncer de mama, a forma predominante é VEGF 121 (Zhang *et al.*, 1995),

enquanto que a variante 165 é encontrada em maior quantidade nos glioblastomas (Berkman *et al.*,1993) e em melanomas é o VEGF121 que parece predominar (Potgens *et al.*, 1995; Redondo *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002). Cheung *et al* (1998), mostraram que em carcinoma pulmonar, a progressão maligna foi associada com a expressão de VEGF189. A expressão forçada de VEGF121 e VEGF165 em células WM1341B (derivadas de melanoma humano em estágio inicial) resultou em um agressivo crescimento tumoral, o que não aconteceu com VEGF189 (Yu *et al.*, 2002). Alterações no splicing de VEGF têm sido detectadas durante a carcinogênese em pele na presença do v-oncogene H-ras (Tober *et al.*, 1998). Em estudos imunohistoquímicos, a alta expressão de VEGFA está associada com a progressão dos melanomas (Bryehtova *et al.*, 2008; Einspahr *et al.*, 2007) e o aumento da expressão desta proteína parece ser um indicador de transformação maligna de nevos displásicos para melanoma (Einspahr *et al.*, 2007).

A proteína anti-angiogênica VEGF165b possui baixa expressão em melanoma metastático (Pritchard-Jones *et al.*, 2007), em carcinomas de próstata (Woolard *et al.*, 2004) e de rim (Bates *et al.*, 2002). A expressão forçada de VEGF165b em células de sarcoma de Ewing reduziu o crescimento tumoral em camundongos, assim como a proliferação e migração endotelial em meio condicionado (Rennel *et al.*, 2008). O mecanismo pelo qual VEGFb limita o crescimento tumoral ainda não está elucidado, contudo, é evidente a partir de estudos anteriores que VEGF165b é capaz de se ligar tanto a VEGFR-1 (Cebe *et al.*, 2006) como VEGFR-2 (Woolard *et al.*, 2004), porém, desencadeia uma fraca sinalização (Woolard *et al.*, 2004; Cebe *et al.*, 2006).

2.9. Atividade de FASN e VEGF

A alta expressão do oncogene erbB-2 está associada com progressão tumoral acelerada e desenvolvimento de metástases e *FASN* é um dos genes regulados por erbB-2 nas etapas de transcrição e tradução. Como descrito anteriormente, já foi demonstrado que a inibição farmacológica da atividade de FASN e o silenciamento da expressão do gene que codifica esta enzima, inibem especificamente a expressão de erbB-2 e sua atividade tirosina-quinase em

células de câncer de mama e ovário que apresentam expressão elevada deste receptor. A alta expressão de erbB-2 está também relacionada com expressão aumentada do fator indutor de hipóxia-1 α (HIF-1 α), fator de transcrição que regula a expressão de vários genes, incluindo o *VEGF*.

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

Browne *et al.* (2006) demonstraram que orlistat inibe FASN nas células endoteliais, bloqueando a síntese de ácidos graxos e prevenindo a sua proliferação. Da mesma maneira, orlistat inibe a neovascularização humana em ensaio *ex vivo*, o que sugere que esta pode ser uma potente droga anti-angiogênica. Segundo estes autores, o efeito pode ser atribuído ao fato de que orlistat previne a expressão do VEGFR-2 na superfície das células endoteliais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar o efeito da inibição de FASN com orlistat sobre a angiogênese induzida em modelo murino com melanoma.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Verificar o efeito da inibição de FASN com orlistat sobre a indução da angiogênese através do implante intradérmico de células B16F10 no ventre de camundongos C57Bl6.

3.2.2. Estudar as conseqüências da inibição da atividade de FASN com orlistat sobre a expressão de RNAs mensageiros de FASN e VEGFA nos tumores, através de reações de RT-PCR semi-quantitativo.

3.2.3. Estudar as conseqüências da inibição da atividade de FASN com orlistat e cerulenina sobre as taxas de proliferação pelas células RAEC.

3.2.4. Analisar as conseqüências na indução da proliferação da linhagem RAEC por fatores liberados em meio condicionado por células B16F10.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

As linhagens B16F10 (ATCC), derivada de um melanoma de camundongo, e RAEC, derivada do endotélio da aorta de coelho (gentilmente cedida pela Profa. Dra. Helena B. Nader, do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Ciências Biomédicas da Unifesp), foram utilizadas na presente pesquisa. As células foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (NUNC, Dinamarca) com meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, E.U.A) ou HAM-F12 (Cultilab, Brasil) 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.

O subcultivo foi realizado quando as culturas atingiam uma confluência cerca de 70%. Para isto, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e então incubadas a 37°C com de tripsina a 2%, para a linhagem B16F10, e pancreatina a 10% (SIGMA, E.U.A.), para a linhagem RAEC. Após um período que variou de 1 a 3 minutos para tripsina e de 20 a 30 minutos para a pancreatina, as células ficavam separadas da superfície do frasco de cultura (que foi determinado por observação em microscópio de contraste de fase), sendo então a ação da tripsina ou da pancreatina interrompida pela adição de 5 ml (frasco de 25 cm²) ou 10 ml (frasco de 75 cm²) de meio de cultura contendo 10% de FBS. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning, E.U.A.) e estes centrifugados a 800 xg por 3 minutos. O sobrenadante foi removido e descartado e os “pellets” de células ressuspensos em 5 ml de meio de cultura com 10% de FBS, as células contadas e re-plaqueadas em novos frascos de cultura. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Visando manter o estoque congelado em nitrogênio líquido e trabalhar sempre com as células em passagens semelhantes, congelamos várias amostras de cada linhagem celular antes da realização dos experimentos. Para isto, as células foram suspensas em solução 1/1 contendo 20% de di-metil sulfoxido (DMSO, Sigma, E.U.A.) e RPMI 1640 ou

HAM-F12 com 50% de FBS e congeladas em nitrogênio líquido. Para descongelar as células, os criotubos (NUNC, Dinamarca) foram colocados em banho de água a 37°C e, após rápido descongelamento, transferidas para tubos de 15 ml contendo 10 ml de meio e centrifugadas. Os “pellets” foram então ressuspensos em 5 ml de meio de cultura e as células plaqueadas para realização dos experimentos. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as linhagens subcultivadas no máximo por dez passagens e então descartadas. Todos os experimentos apresentados neste trabalho foram feitos com o mesmo lote de FBS, para evitar variações indesejáveis no padrão de crescimento celular decorrentes de sua composição.

4.2. Preparo das soluções de orlistat

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 1 ml de etanol a 33% em PBS, seguido de agitação por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a solução foi centrifugada a 16.000 xg por 5 minutos e o sobrenadante coletado e estocado a -80°C até o momento do uso. Para o uso em experimentos de cultura celular, o mesmo protocolo foi seguido, entretanto, etanol absoluto (Merck, Alemanha) foi utilizado para dissolver o conteúdo das cápsulas do medicamento.

4.3. Análise da proliferação celular e do ciclo celular

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

Para a análise da proliferação celular, foram plaqueadas 8×10^3 células RAEC em cada poço de placas de 24 poços com 1ml meio HAM-F12 suplementado com 10% FBS. Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi substituído por HAM-F12 sem FBS e as células incubadas por mais 24 horas, quando então se iniciou o tratamento com orlistat a 100 μ M ou etanol como

controle e cerulenina a 0,70 µg/ml (Sigma, E.U.A.) e DMSO como controle, agora novamente em meio contendo 10% de FBS. As células foram coletadas a cada 24 h após o início do tratamento e contadas em câmaras de Neubauer, por 8 dias.

Para a análise da distribuição das células dentre as fases do ciclo celular, foram plaqueadas 4×10^4 células RAEC em placas de 6 poços em meio HAM-F12 suplementado com 10% FBS. Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi substituído por HAM-F12 sem FBS e as células incubadas por mais 24 horas, quando então se iniciou o tratamento com orlistat a 100 µM e etanol como controle ou cerulenina a 0,70 µg/ml ou DMSO como controle, novamente em meio contendo suplemento com 10% de FBS. As células foram coletadas depois de 48, 72 e 96 horas, fixadas com etanol a 70% gelado, colocadas a -20°C por 12 horas, lavadas em PBS gelado e tratadas com 10 µg/ml de RNase durante 1 hora a 37°C. Após incubação com 50 µg/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.

4.4. Ensaio de proliferação de células endoteliais em meio condicionado

Para verificar o efeito de fatores secretados por células de melanoma sobre o crescimento das células RAEC, foram plaqueadas 4×10^4 células RAEC por poço de placas de cultura de 6 poços em meio HAM-F12 suplementado com 10% FBS. Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi substituído por HAM-F12 sem FBS e as células incubadas por mais 24 horas, quando então se iniciou a incubação com 1 ml (50%) ou 1,6 ml (80%) de meio RPMI 1640 suplementado com 10% FBS metabolizado por um período de 24 horas por aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células B16F10, acrescentado 1 ml ou 0,40 ml de meio HAM-F12 suplementado com 10% de FBS. Como controle, utilizou-se 1 ml ou 1,60 ml de meio HAM-F12 suplementado em 10% FBS metabolizado por cerca de 1×10^6 células RAEC por um período de 24 horas acrescido de 1 ml ou 0,40 ml de HAM-F12 novo suplementado com 10% de FBS. Para verificar a distribuição das células nas fases

do ciclo celular, as células tratadas com 1 ml (50%) de meio condicionado foram coletadas depois de 48 e 72 horas e para as células tratadas com 1,6 ml de meio condicionado (80%) a coleta foi nos períodos de 48, 72 e 96 horas. Para estimar o número de células, estas foram coletadas depois de 48, 72 e 96 horas, como descrito anteriormente, e contadas utilizando o software CellQuest em um citômetro de fluxo FACSCalibur.

4.5. Modelo animal para estudo da angiogênese

O modelo animal utilizado neste trabalho para o estudo de angiogênese induzida pelo melanoma foi descrito por Leyon e Kuttan, em 2004. A presente pesquisa foi aprovada pela Comitê de Ética na Experimentação Animal (n° 1773-1, CEEA-IB-UNICAMP – anexo I).

Setenta e um camundongos C57Bl6, divididos em quatro experimentos independentes (Tabela 1), com cerca de 6 semanas de vida 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 intradérmicos de células B16F10 (10^6) suspensas em PBS. Concomitantemente às inoculações, deu-se início ao tratamento com 60 μ l da solução de orlistat (o que corresponde a 240 mg/kg/dia – via i.p.) durante nove dias. Os animais dos grupos controle receberam injeções somente do veículo (solução de etanol em PBS a 33%). Nove dias após os implantes das células, todos os animais foram sacrificados e imediatamente dissecados, a pele do ventre do animal foi removida e cuidadosamente lavada com PBS para a realização da contagem dos vasos direcionados ao tumor, com o auxílio de um microscópio de dissecação (DV4, Zeiss, Alemanha) e uma câmara fotográfica (G6, CANON, E.U.A.) acoplada a ocular em aumento de 20X. Os tumores foram medidos e o volume calculado pela fórmula $volume (mm^3) = largura^2 \times (mm^2) \times comprimento \times 0,52$ (Rennel *et al.*, 2008). Posteriormente os fragmentos contendo o tumor

aderido a pele ventral dos animais foram incluídos em parafina para futura análise microscópica.

A contagem dos vasos que se direcionavam ao tumor foram realizadas de duas formas. A primeira análise teve como objetivo estimar a extensão dos vasos sanguíneos peritumorais dentro de um contorno feito sobre a margem irregular do tumor (Figura 3 do item 5.2). Esta região foi considerada como a área peritumoral e o comprimento dos vasos dentro dela foi verificado com o auxílio do programa Scion Image (Scion Corporation, E.U.A.). Na segunda análise, foi avaliada somente a área ocupada por pequenos e tortuosos vasos sanguíneos peritumorais, também através do programa Scion Image (Figura 5 do item 5.2).

Em uma segunda etapa dos experimentos, 35 camundongos (C57Bl6) foram implantados com células B16F10 e tratados com orlistat como descrito anteriormente e, após o sacrifício, os tumores e os fígados foram removidos e imediatamente congelados a -80°C .

Tabela 1: A tabela mostra a quantidade de animais em cada grupo nos quatro experimentos realizados de maneira independente.

Distribuição do número de animais por grupo				
Gupos	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	7	9	10	9
Orlistat	8	10	9	9
Total	15	19	19	18

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

RNA total foi extraído do tecido tumoral previamente congelado e de “pellets” celulares usando o reagente Trizol (Invitrogen). Antes das reações de RT, todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1 U de DNase I (Amplification Grade, Invitrogen) por 10 minutos a temperatura ambiente, para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. Para a síntese de cDNA, $2\mu\text{g}$ de RNA total foram reversamente transcritos em uma reação com volume final de $21\mu\text{l}$, contendo $0,5\text{ mM}$ de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de

RNAse, 50 U da enzima Superscrit II RT (Invitrogen), 0,5 μ M de “primers” oligo-dT (Invitrogen) e tampão 1 X (contendo 1,5 mM $MgCl_2$). As reações foram realizadas a 42 °C por 50 minutos, seguidas de incubação a 70°C por 15 minutos. Reações sem a enzima RT foram usadas como controles negativos. Para a amplificação dos cDNAs através de PCR, “primers” específicos para cada RNA mensageiro estudado foram delineados usando o programa “Amplify 1.2” (Universidade de Wiscosin, Madison, E.U.A.). As sequências dos “primers” específicos para FASN de camundongo (sense: ATGATGCAGGGCCATCCTGA; anti-sense: TCACGTGCAGTTTAATTGTG), VEGFA de camundongo (sense: AAAGCCAGCACATAGAG anti-sense: ATGGTGGTGACATGGTT), e β -actina (sense: CATCCTCACCTGAAGTACC; antisense: GGTGAGGATCTTCATGAGGT) foram provenientes do “GenBank” (NCBI - “National Center for Biotechnology Information” - NIH, E.U.A.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os produtos gerados pelo primer VEGFA (375, 323, 307, 251, 192, e 119 pb) correspondem respectivamente aos RNAs das suas isoformas (205, 188, 182, 164, 144 e 120) esquematizados na Figura 1.

Os transcritos para FASN, VEGFA e β -actina foram amplificados em reações de 50 μ l contendo 2 μ l de cada cDNA, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 0,2 mM de cada “primer”. As condições do PCR foram: 95 °C por 5 minutos, 45 ciclos de 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 4 minutos. Para os transcritos de β -actina a temperatura de anelamento utilizada foi de 55°C por 45 segundos. Dezesesseis microlitros de cada produto de PCR foram separados em géis de agarose a 1,8% e corados com brometo de etídeo. O número de ciclos utilizados para cada “primer” foi determinado através da construção de curvas de amplificação (item 5.4 de Resultados), sendo realizada uma curva para cada produto gerado pela amplificação de VEGFA (Figura 1). As bandas foram analisadas por densitometria, sendo os resultados normalizados pela divisão dos valores obtidos para FASN e VEGFA pelos valores do gene de referência β -actina.

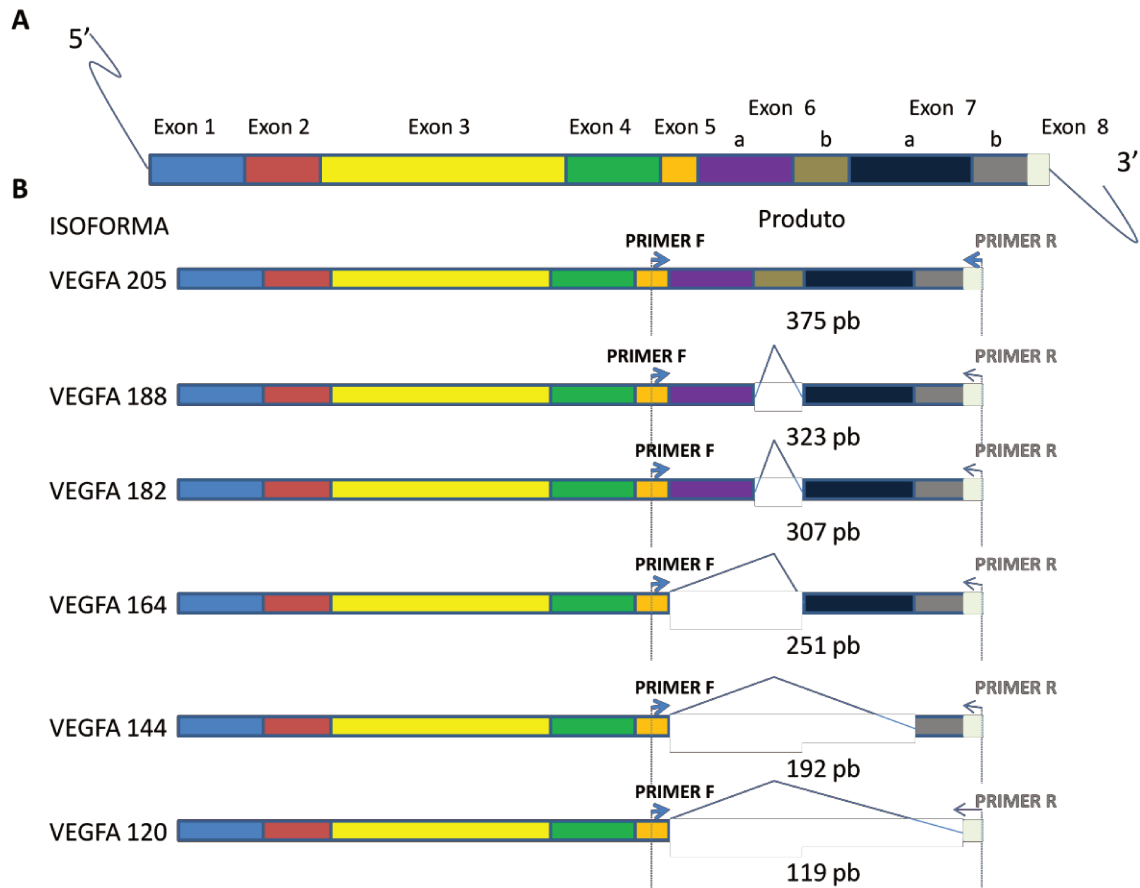


Figura 1: Esquema representativo do modelo do pre-RNA mensageiro de VEGFA murino (A) e seus principais variantes a partir de “splicing” alternativo entre os exons 6 e 7 (B). Em B, estão representados os “primers” (setas azuis); sendo que o “primer F” localiza-se no exon 5 e o “primer R” no exon 8, regiões comuns para todas as isoformas de VEGFA.

4.7. Análise Estatística.

Os resultados obtidos nos ensaios de RT-PCR foram quantificados por análise densitométrica, que com o auxílio de um densitômetro modelo GS-700 (Bio Rad, E.U.A.) e do programa Molecular Analyst (Bio Rad). Após obtenção dos valores médios de cada período de contagem das curvas de proliferação, foram construídos gráficos utilizando-se o programa Excel (Microsoft, E.U.A.). A significância estatística dos resultados foi verificada através da análise de variância não paramétrica do teste *t* de Student e teste de Mann-Whitney, com o auxílio do programa computacional SigmaStat (Jandel Scientific Software, EUA). O nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Estudo piloto para avaliação da angiogênese induzida pelo implante intradérmico de células B16F10

Quatro dias após os implantes celulares já foi possível observar pequenos aumentos volumétricos de formato nodular e coloração azulada no abdômen, o que caracterizava o início do crescimento macroscópico dos tumores experimentais. De uma maneira geral, com o presente protocolo, os camundongos podem sobreviver mais do que 10 dias após o implante das células de melanoma na pele ventral. Entretanto, como o nosso interesse principal era visualizar a neoformação de vasos sanguíneos, eles foram sacrificados no 10º dia após as inoculações, como realizado no trabalho de Leyon e Kuttan (2004). As Figuras 2 A, B e C mostram, logo após o sacrifício, a pele ventral que foi dissecada e removida, na qual pode-se observar vasos sanguíneos se direcionando para a massa tumoral. Os tumores apresentaram coloração negra e consistência mole, eram relativamente bem delimitados e localizados, na maioria dos casos, na região dos implantes celulares.

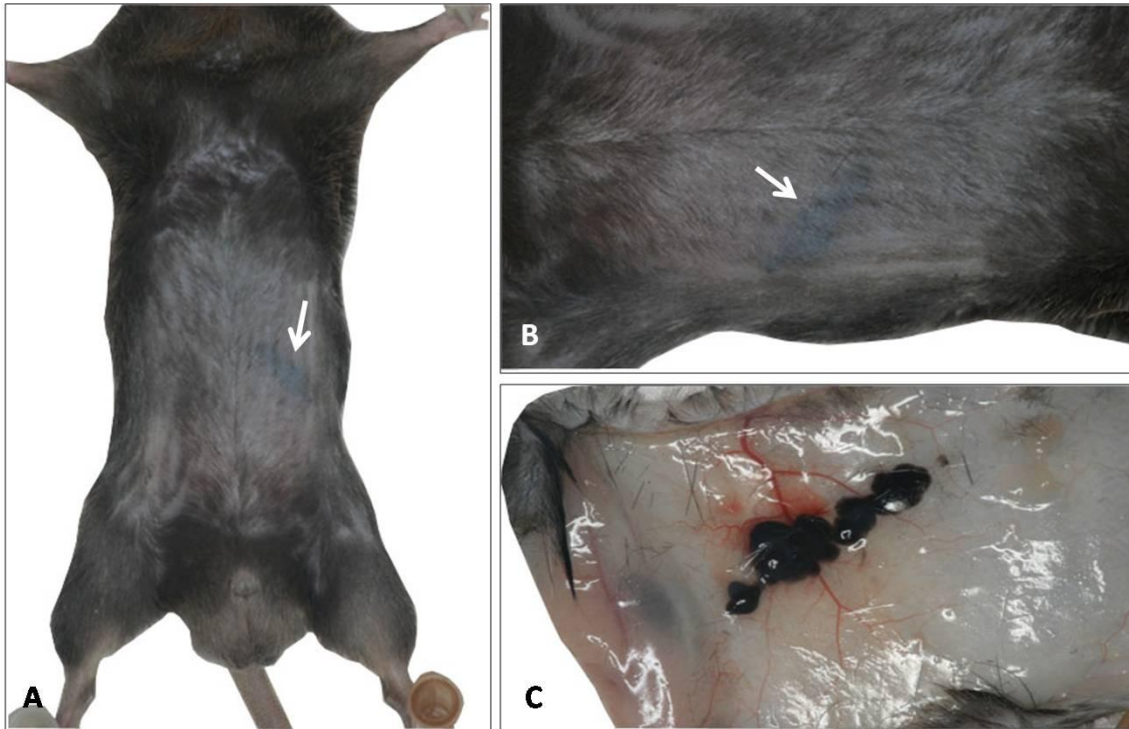


Figura 2. Camundongo C57Bl6 representativo do modelo de indução de angiogênese a partir do implante intradérmico de células derivadas de melanoma. Em **A** e **B** observa-se o animal com discreto nódulo azulado na região ventral lateral direita (setas). Na figura **C**, após a remoção da pele ventral, nota-se um tumor relativamente bem delimitado recebendo vasos sanguíneos de calibres variados.

5.2. Avaliação do efeito do orlistat sobre a angiogênese induzida por melanomas experimentais em camundongos C57Bl6

A indução da angiogênese pelo implante intradérmico de células B16F10 foi estudada em 4 experimentos distintos, que utilizaram ao todo 71 camundongos C57Bl6 (35 controles e 36 tratados). O tratamento com orlistat começou no mesmo dia da injeção das células B16F10, o que permitiu a verificação do efeito da droga sobre a angiogênese induzida pelo melanoma em crescimento. Em todos os experimentos realizados, observamos que a quantidade de vasos que se direcionavam ao tumor foi maior nos grupos controles do que nos grupos tratados com orlistat, sendo que os vasos dos primeiros também tinham mais ramificações pequenas e de formato tortuoso. Tanto a extensão como a área de ramificação dos vasos sanguíneos foram estimadas com o auxílio do programa *Scion Image*, o que demonstrou que os camundongos tratados com orlistat formaram menos vasos sanguíneos com poucas áreas de ramificação, em comparação com os animais controle (Figuras 3, 4, 5 e 6).

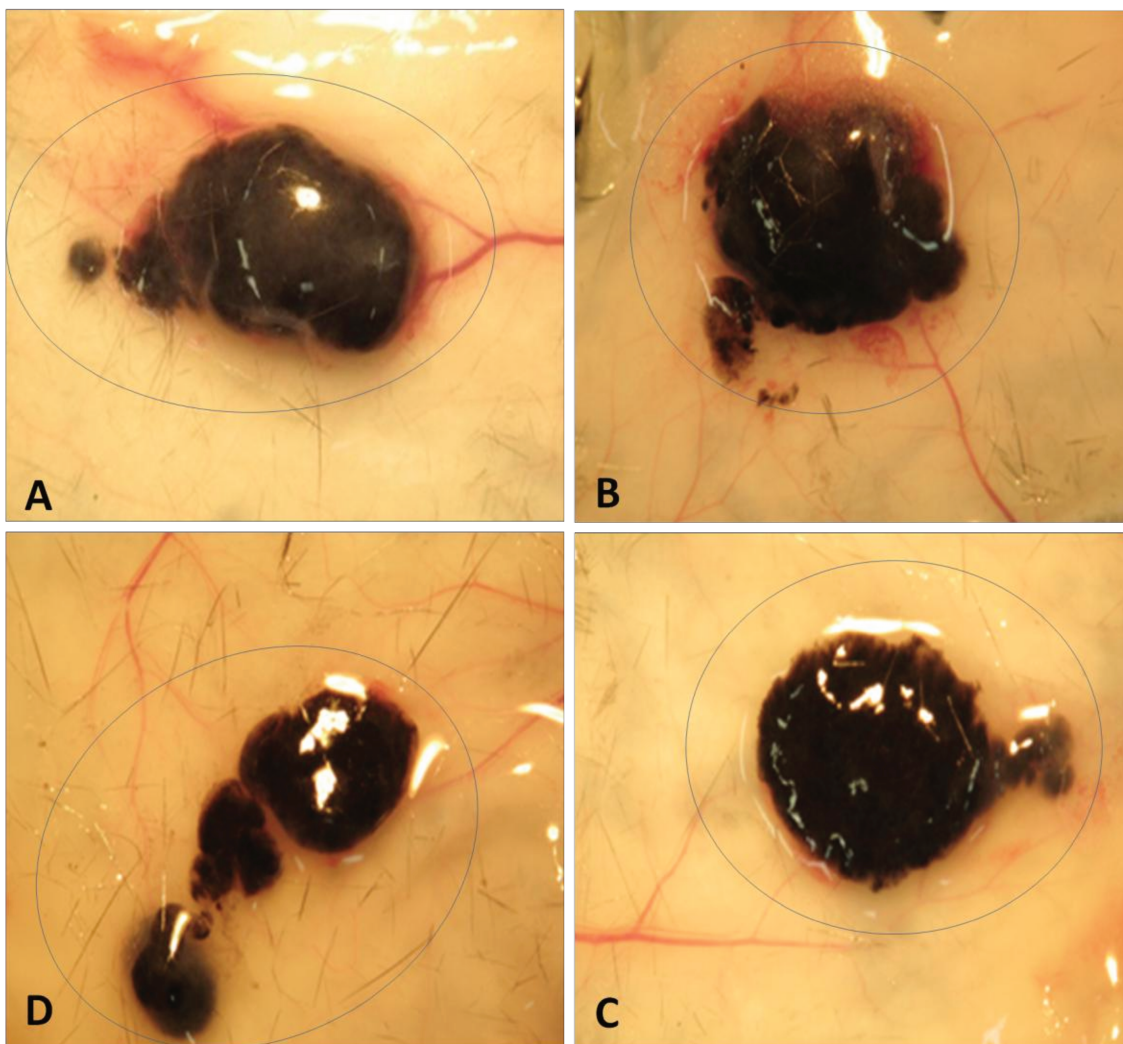


Figura 3: Imagens representativas da angiogênese peritumoral em camundongos C57Bl6 tratados com etanol (**A e B**) ou com orlistat (**C e D**). No grupo controle, observa-se maior ramificação e extensão dos vasos peritumorais, em comparação com o grupo tratado com orlistat. O contorno em azul demarca a região onde foram mensuradas os vasos sanguíneos, cuja área foi usada para normalizar os valores de extensão (Aumento Original: 20 X).

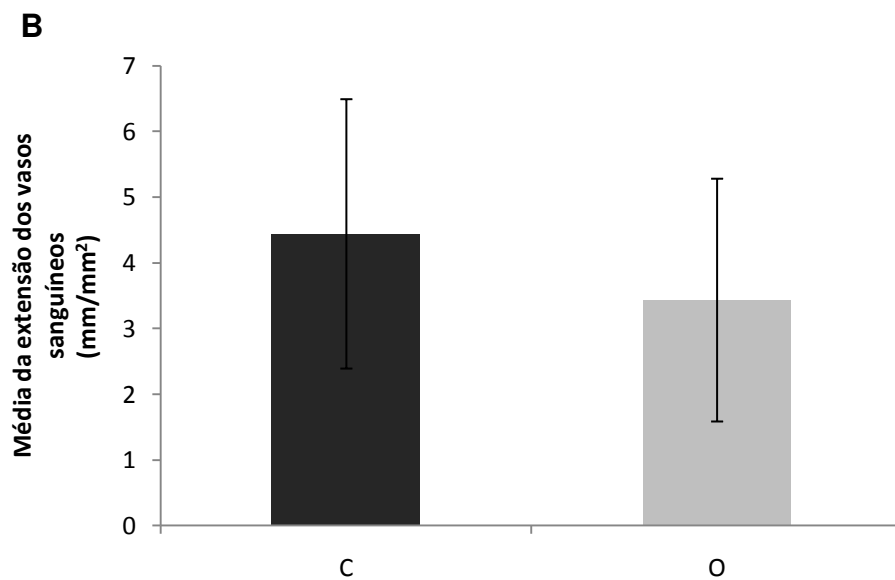
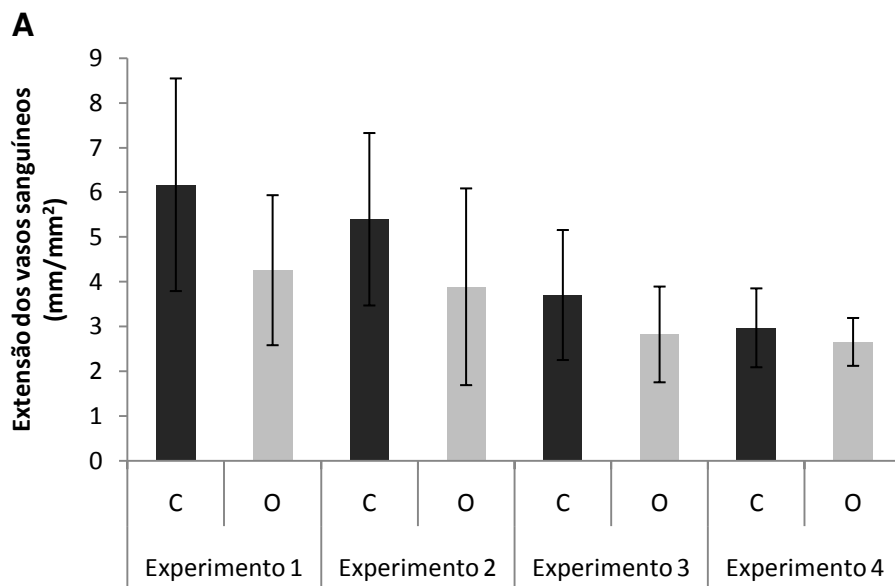


Figura 4: Medidas da extensão dos vasos sanguíneos peritumorais em áreas previamente demarcadas, como exemplificado na Figura 3 (C). Pode-se notar que os grupos tratados com orlistat (O) tiveram vasos sanguíneos peritumorais menos extensos do que os controles (C). Em **B**, a média dos quatro experimentos mostrados em **A** ($p=0,024$; teste de Mann-Whitney).

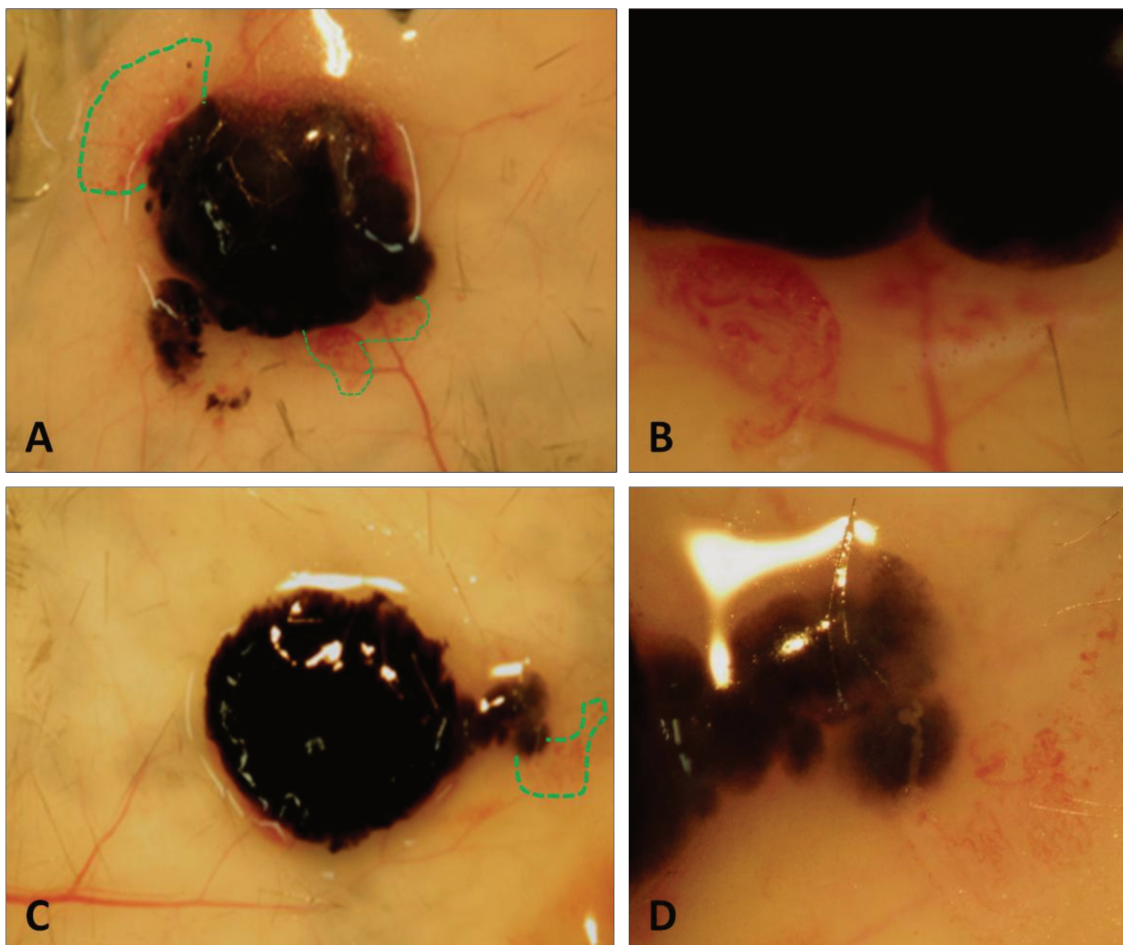


Figura 5: Imagens representativas das áreas com ramificações pequenas e tortuosas dos vasos sanguíneos peritumorais de camundongos C57Bl6 tratados com etanol (**A**) ou com orlistat (**C**). Nos grupos controle foi possível observar mais ramificações, em comparação aos grupos tratados com orlistat. As linhas verdes tracejadas demarcam as áreas mensuradas no programa de computador (Aumento Original: 20 X). As figuras **C** e **D** mostram em maior aumento as regiões demarcadas em **A** e **B** (Aumento Original: 25X).

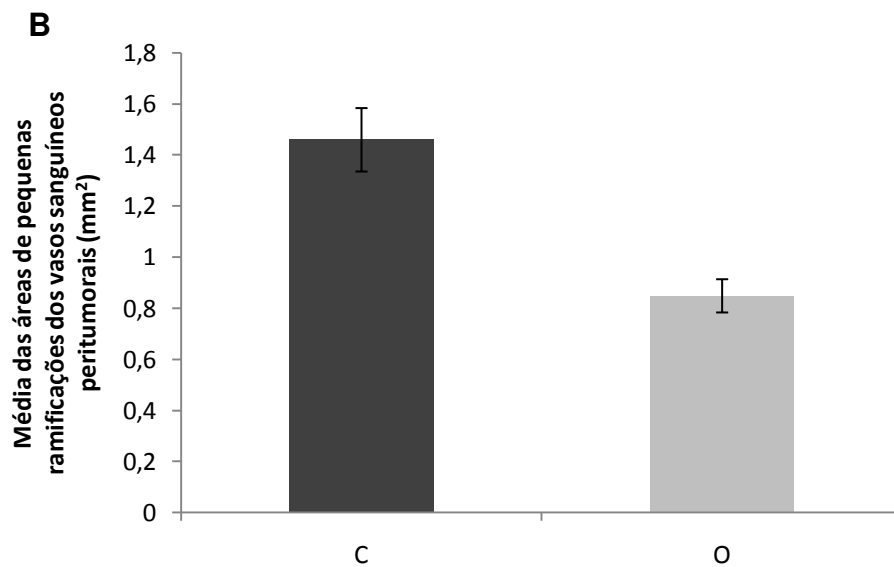
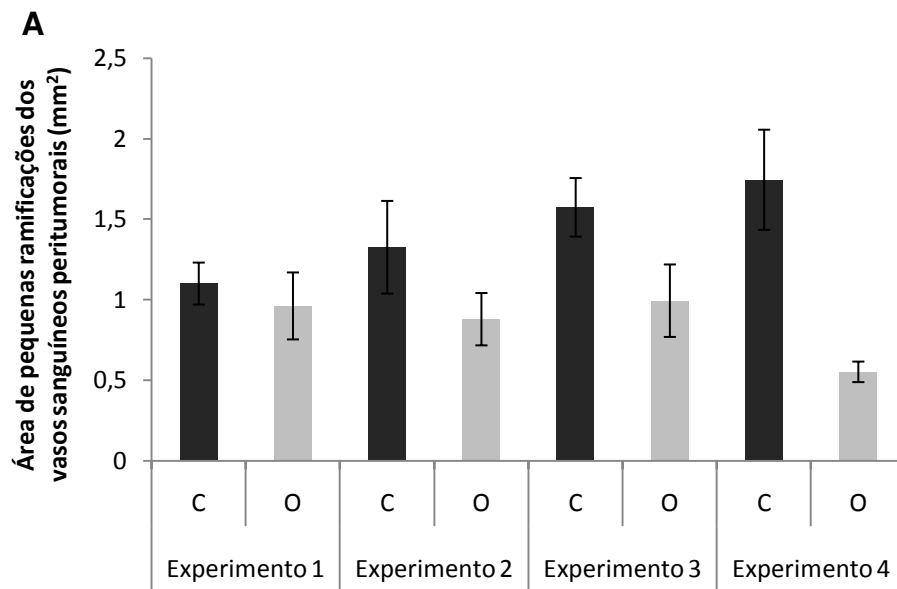


Figura 6: O gráfico mostrado em A representa as medidas das áreas ocupadas pelas pequenas ramificações dos vasos sanguíneos peritumorais. Podemos notar que os grupos de animais tratados com orlistat (O) tiveram esta área menor do que aqueles que receberam etanol como controle (C). A figura B mostra a média dos quatro experimentos da figura A ($p=0,002$; teste de Mann-Whitney).

5.3. Efeito da inibição de FASN com orlistat sobre o volume dos melanomas experimentais

Nos experimentos realizados, os volumes alcançados pelos tumores foi bastante variado. A Figura 8 mostra os valores dos volumes tumorais obtidos nos 4 experimentos. Pode observar que a inibição de FASN com orlistat não alterou o crescimento dos tumores, pois nos experimentos 1 e 2 houve aumento volumétrico nos animais tratados enquanto que nos experimentos 3 e 4 ocorreu discreta redução do volume.

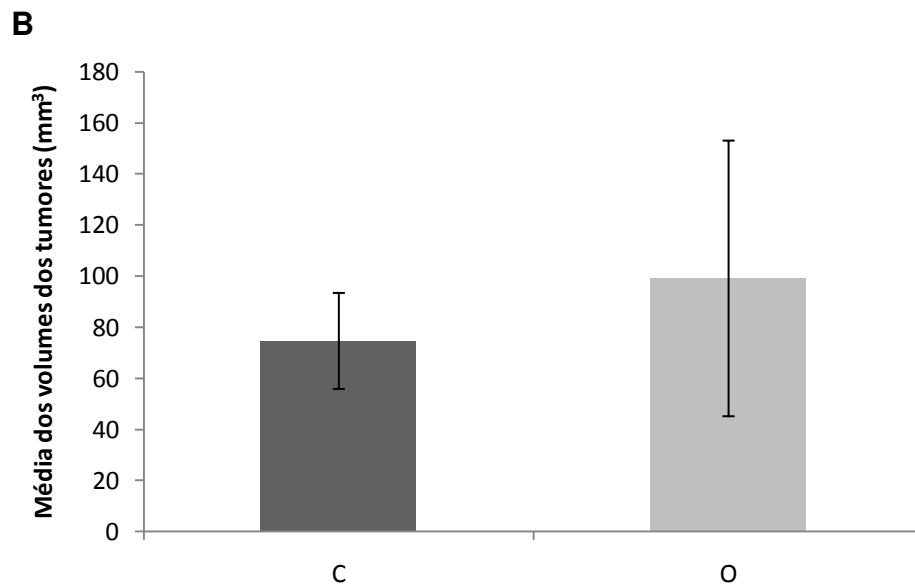
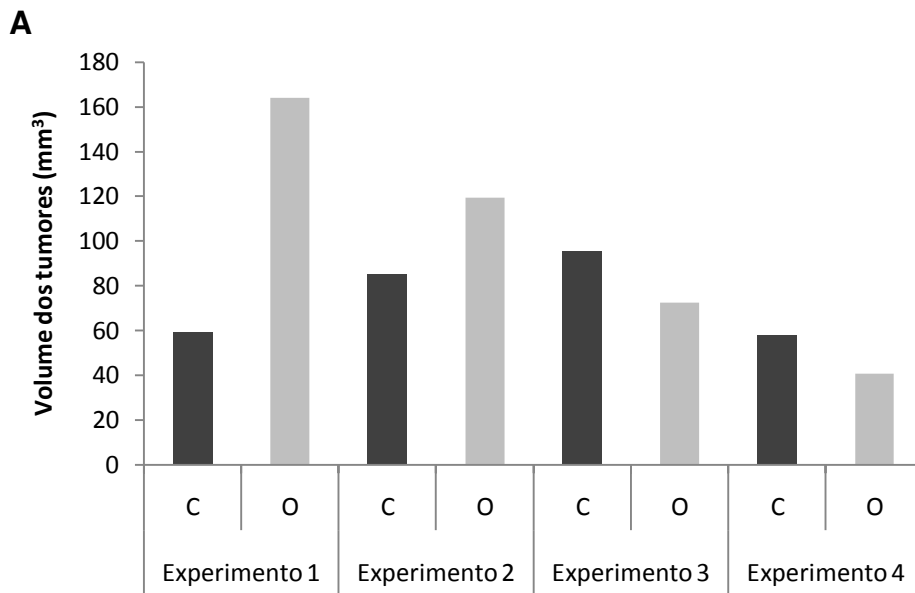


Figura 7: O gráfico da figura **A** mostra que os volumes dos tumores foi maior nos grupos controles (C) nos experimentos 3 e 4 o contrário ocorreu nos experimentos 1 e 2. Em **B** podemos observar que a média dos volumes, considerando-se os quatro experimentos realizados, foi maior no grupo tratado com orlistat (O), embora não significativo do ponto de vista estatístico ($p=0,424$; teste t de Student)

5.4. Detecção de RNAs mensageiros para VEGF-A através de RT-PCR semi-quantitativo

Inicialmente, para verificar a integridade do RNA total extraído dos fragmentos tumorais, assim como de fígado e da linhagem celular B16F10 (controles positivos), amostras foram preparadas e resolvidas em géis desnaturantes de formaldeído-agarose a 1,2%, os quais foram corados com brometo de etídeo (Figuras 9 e 10).

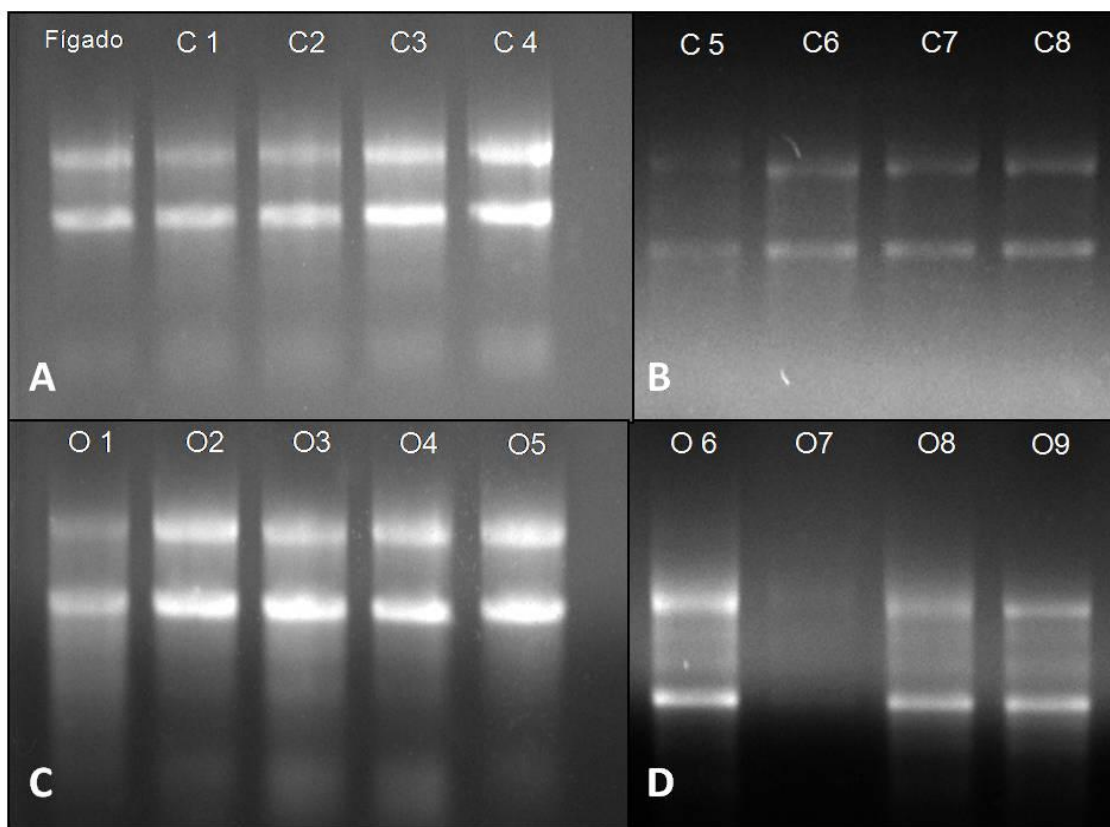


Figura 8: Géis de formaldeído-agarose a 1,2% corados com brometo de etídeo, nos quais foi aplicado 1 μ g de RNA total em cada canaleta para verificação da integridade através da observação das bandas de RNA ribossômico 18S e 28S. Em **A**, **B** e **C** podemos constatar a integridade do RNA de todas as amostras. Em **D**, verificamos a degradação do RNA na amostra Tumor Orlistat 7 (O7) e boa qualidade do restante das amostras.

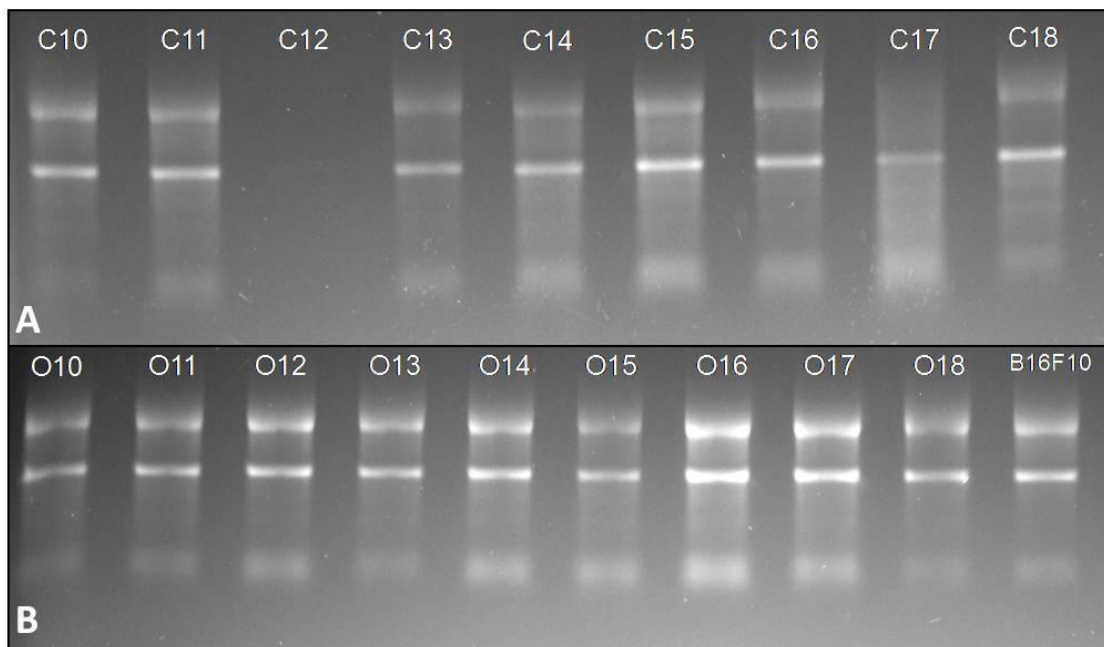


Figura 9: A e B géis de formaldeído-agarose a 1,2% onde foi aplicado 1ug de RNA total em cada canaleta, evidenciando a integridade das mesmas. Em **A** verificamos a degradação do RNA na amostra Tumor Controle 12 (C12).

A seguir, os RNAs totais com qualidade aceitável foram convertidos em cDNA e utilizados em reações de PCR para verificar a expressão de VEGFA. Os primers foram desenhados para amplificar as isoformas 205, 188, 182, 164, 144 e 120 do VEGFA e amostras do Tumor Controle 4 (C4) e Fígado utilizadas para localizar a fase exponencial de amplificação para cada um dos produtos gerados (Figura 10). Várias reações de PCR idênticas foram montadas para cada produto gerado e paralizadas em intervalos de 3 ciclos, sendo depois da eletroforese e densitometria das bandas selecionados 30 ciclos para β -actina e 46 ciclos para todas as isoformas do VEGFA. Nestas condições, nossas análises de expressão gênica seriam realizadas dentro da fase exponencial da reação de PCR, evitando-se todas as limitações inerentes à fase final de platô.

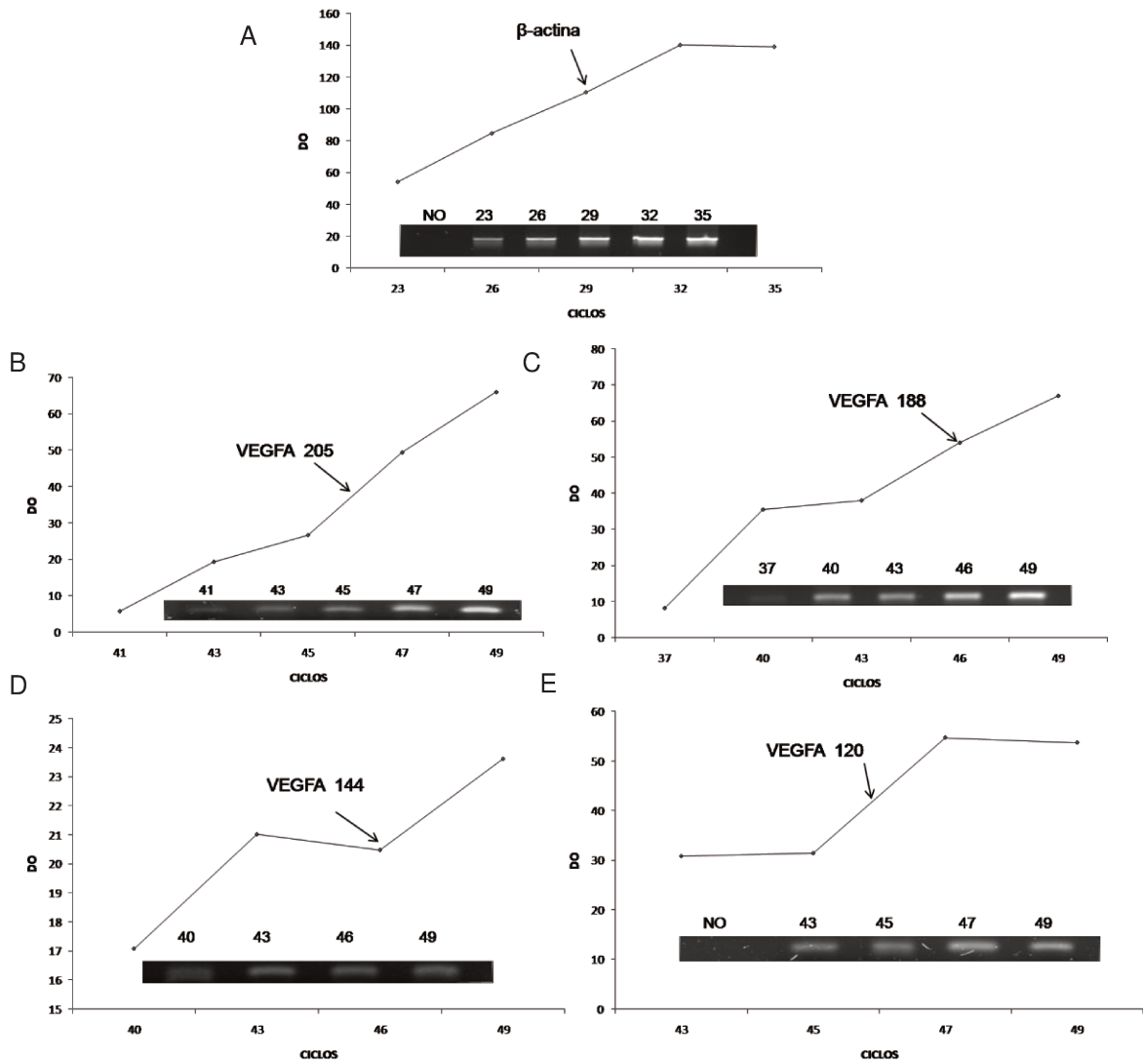


Figura 10: Padronização do número de ciclos para as reações de RT-PCR semi-quantitativo com “primers” para β -actina (A) e VEGFA isoformas 205 (B), 188 (C), 144 (D) e 120 (E). Nos insertos de cada gráfico encontram-se os géis de agarose corados com brometo de etídeo com as bandas obtidas após a paralização da reação nos ciclos indicados. Os gráficos mostram os resultados da análise densitométrica de cada banda e as setas indicam o ciclo escolhido para cada produto amplificado.

Depois de identificar o número de ciclos ideal para cada produto, reações de PCR foram realizadas simultaneamente com todas as amostras para comparar a produção das isoformas de VEGFA nos tumores dos grupos tratados ou não com orlistat. Em três (Figuras 11, 12, 13 e 14) experimentos realizados de maneira independente, constatou-se que os tumores dos grupos tratados com orlistat foram os que apresentaram a maior expressão das isoformas de RNAs mensageiros para VEGFA, em comparação com os grupos controles tratados somente com etanol.

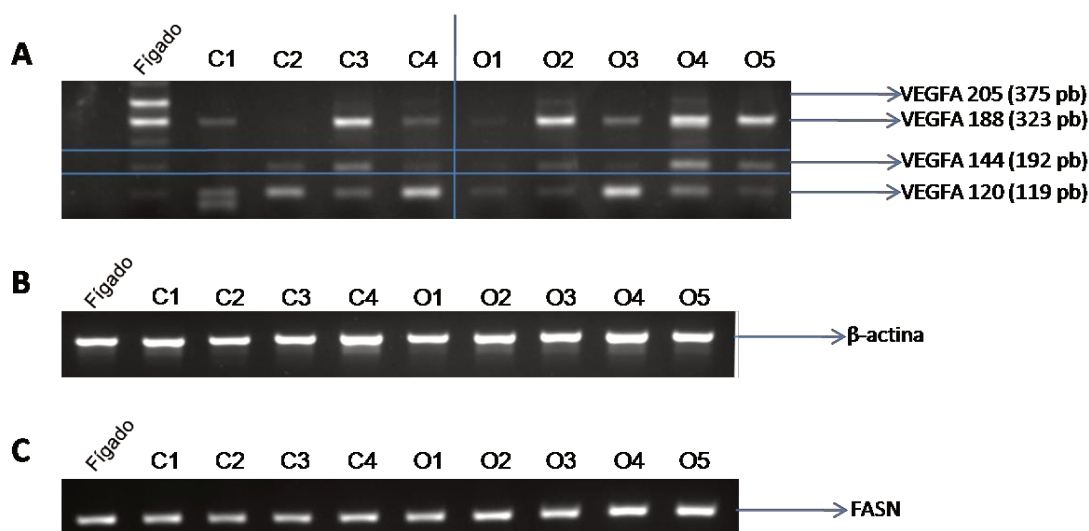


Figura 11: Gel de agarose a 1,8% onde foram aplicados 16 µl dos produtos de RT-PCR realizado com 2 µg das amostras de RNA da Figura 8 **A** e **C**. Observa-se que, de uma forma geral, as amostras do grupo tratado com orlistat apresentaram maiores quantidades de RNAs mensageiros para as isoformas de VEGFA, do que as tratadas somente com o controle etanol. A isoforma VEGFA 188 foi a mais expressa, principalmente nos Tumores Orlistat 2, 4 e 5 e Tumor Controle 3. A amplificação do gene referência β-actina foi utilizada como controle interno das reações (**B**). Em **C** verificamos que o tratamento não alterou a expressão dos RNAs mensageiros de FASN.

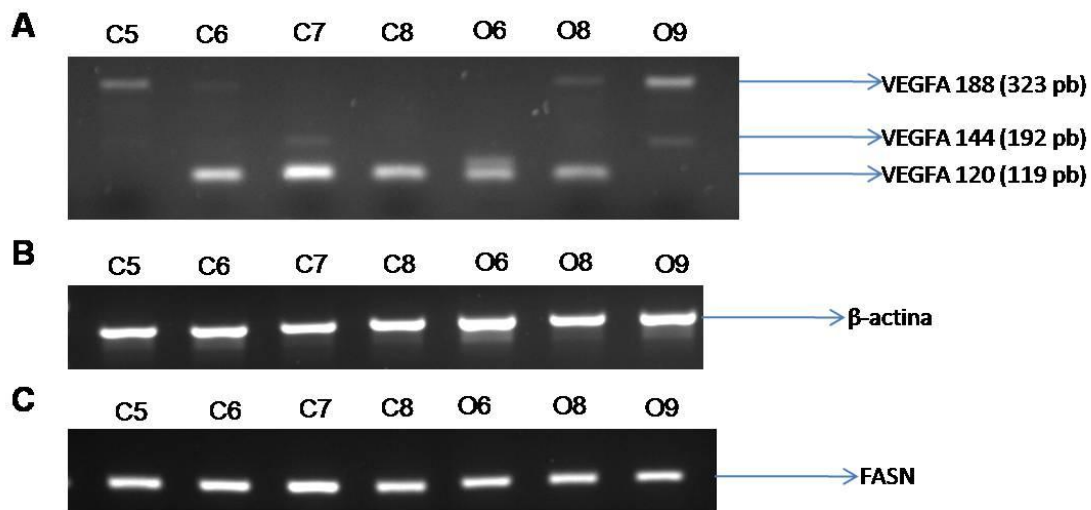


Figura 12: Gel de agarose a 1,8% onde foram aplicados 16 μ l dos produtos de RT-PCR realizado com 2 μ g das amostras de RNA da Figura 9 **A** e **B**. Observa-se que as amostras de tumores dos grupos tratados com Orlistat apresentaram mais isoformas de RNAs mensageiros para VEGFA, quando comparadas com as amostras do grupo controle, sendo a isoforma VEGFA 120 a mais expressa entre os grupos. Em **B** pode-se observar a expressão do gene referência β -actina e em **C** a expressão de FASN que não foi alterada.

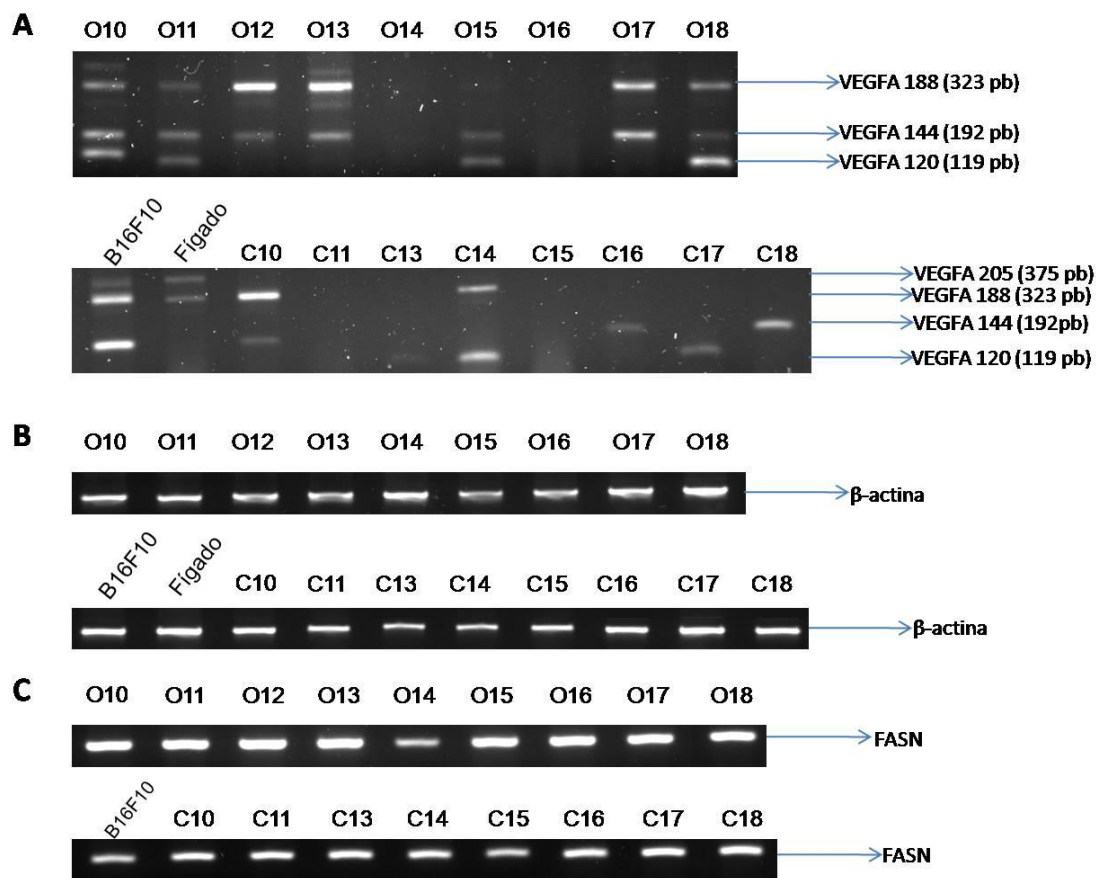


Figura 13: Gel de agarose a 1,8% onde foram aplicados 16 μ l dos produtos de RT-PCR realizado com 5 μ g dos RNAs da Figura 10 **A** e **B**. Da mesma maneira que no experimento apresentado nas Figura 11 **A**, observa-se que as amostras de tumores dos grupos tratados com Orlistat apresentaram maiores quantidades de RNAs mensageiros para VEGFA, quando comparadas com as amostras do grupo controle. Novamente a isoforma VEGFA 188 foi a mais expressa, principalmente nas amostras Tumores Orlistat 12, 13 e 17 e Tumor Controle 10. A expressão do RNA mensageiro para FASN não se alterou com o tratamento (**C**). Em **B** observa-se a amplificação do gene referência β -actina nas mesmas amostras.

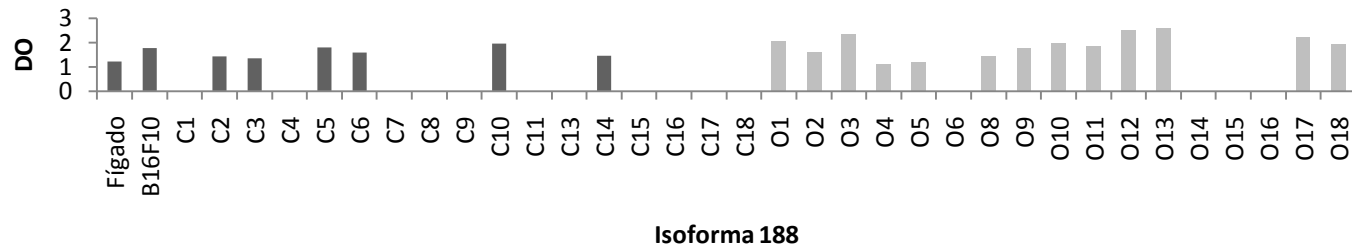
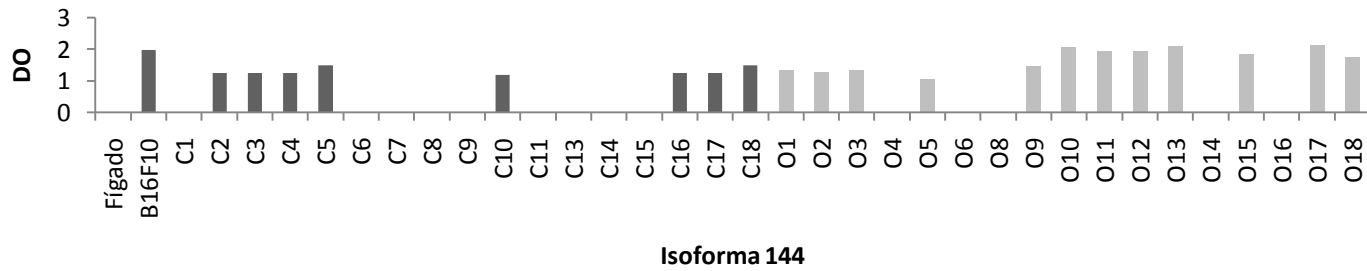
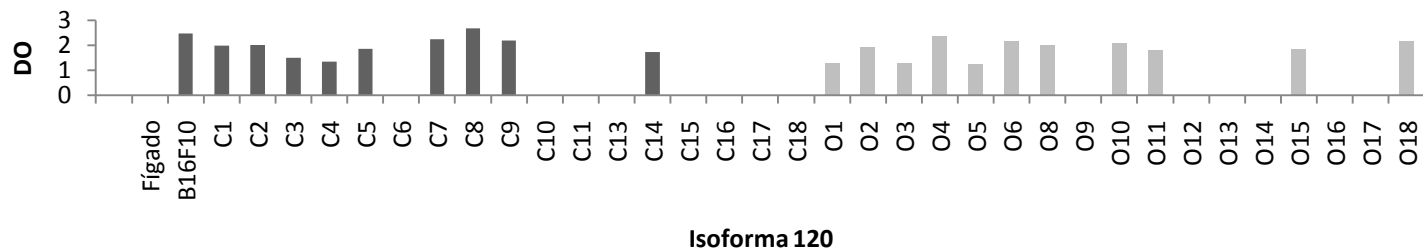
A**B****C**

Figura 14: Representações gráficas das análises densitométricas das bandas de VEGFA normalizadas pelas respectivas bandas de β -actina. Padrão de expressão das isoformas 188 (**A**), 144 (**B**) e 120 (**C**) dos produtos das reações de RT-PCR visualizados nas Figuras 11, 12 e 13 (**A** $p=0,0046$; **B** $p=4,9.10^{-7}$; **C** $p=0,021$; *test t* de Student).

D

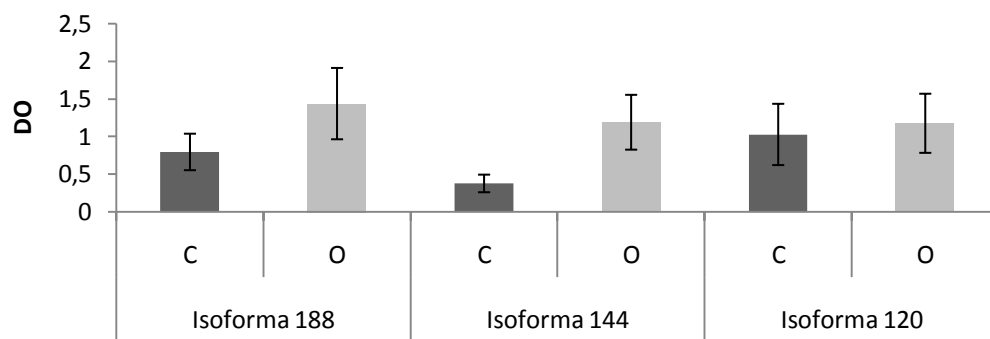


Figura 15: Médias de cada isoforma das Figuras 14 **A**, **B** e **C**, mostrando que a expressão de VEGFA foi maior no grupo tratado com orlistat (barras claras) comparadas ao grupo controle (barras escuras) ($p=0,0048$; teste *t* de Student)

5.5. Efeitos da inibição da atividade de FASN com orlistat ou cerulenina sobre a proliferação de células endoteliais derivadas da aorta de coelho (RAEC)

Tendo-se em vista que os resultados obtidos nos experimentos “*in vivo*” sugerem que a atividade de FASN seja importante para a vascularização dos melanomas provocados pelas células B16F10, nosso próximo objetivo foi verificar o papel desta enzima em cultura de células endoteliais. O potencial de crescimento da linhagem celular RAEC foi inicialmente avaliado através da construção de curvas de proliferação (Figura 16). As células, depois de plaqueadas e devidamente aderidas passaram por um período de carenciamento de 24 h, no qual foram incubadas em meio sem FBS para favorecer a sincronização dos ciclos celulares. Depois da volta do meio de cultura contendo FBS, contagens foram feitas em triplicatas a cada 24 h, durante um período de 8 dias.

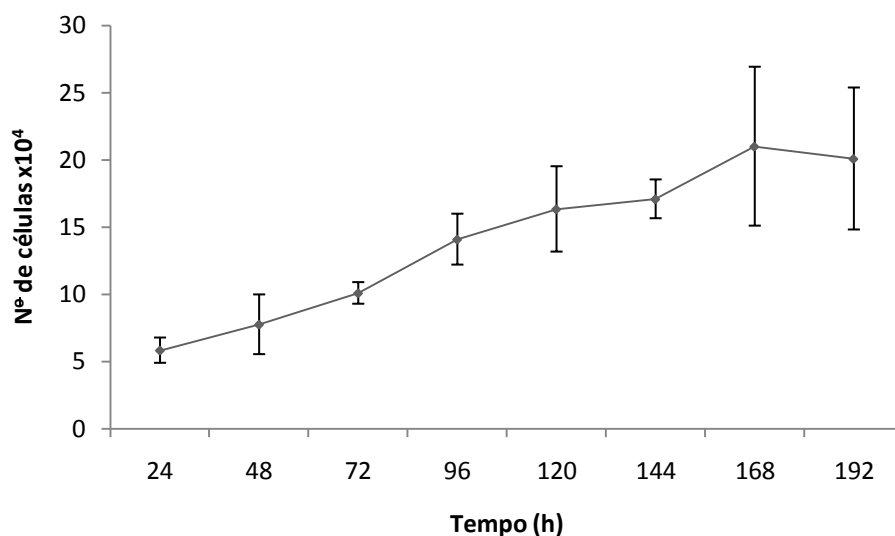


Figura 16: Padrão de proliferação das células RAEC em meio de cultura HAM-F12 contendo 10% de FBS. Gráfico obtido a partir das contagens, em triplicatas, de 3 poços da placa de cultura em intervalos de 24 h com o auxílio de uma câmara Neubauer em microscópio de contraste de fase.

No intuito de observarmos a possível influência da atividade da enzima FASN sobre o controle da proliferação destas células endoteliais, realizamos tratamentos com os inibidores cerulenina ou orlistat. As figuras 17 a 20 mostram estudos nos quais as células RAEC foram expostas à cerulenina ou orlistat.

Podemos observar que houve uma redução importante do crescimento celular quando a atividade de FASN foi bloqueada com apenas 0,7 $\mu\text{g/ml}$ de cerulenina (Figura 17) ou com 100 μM de orlistat (Figura 19). As fotografias obtidas em microscópio contraste de fase ilustram a densidade celular dos poços de cultura nos períodos de 24, 48 e 72 h para o tratamento com cerulenina (Figura 18) e 48, 72 e 96 h para o tratamento com orlistat (Figura 20). Não observamos alterações significativas no aspecto morfológico das células RAEC em nossas condições experimentais.

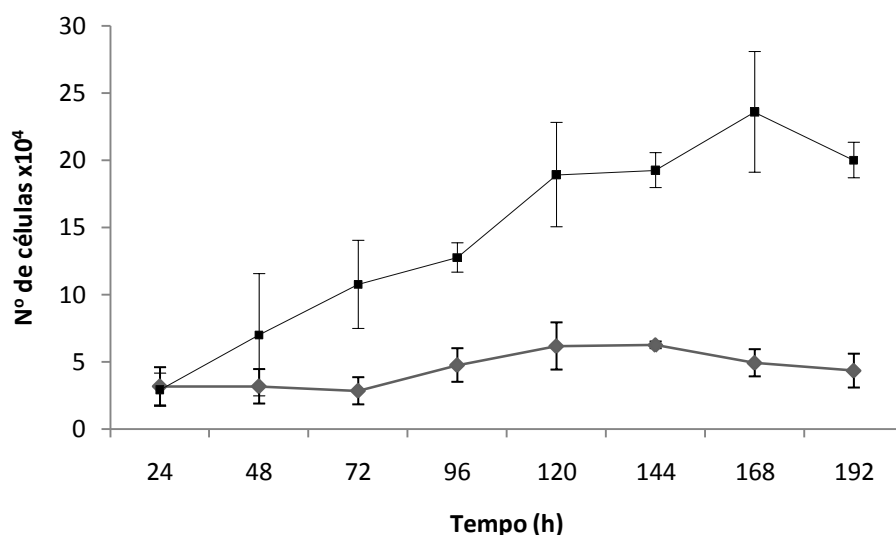


Figura 17: Inibição do crescimento das células RAEC subsequente ao tratamento com 0,7 $\mu\text{g/ml}$ de cerulenina. As células foram cultivadas na presença de cerulenina (◆) ou da quantidade equivalente de DMSO (■) por um período máximo de até 192 h. As contagens celulares foram feitas com o auxílio de uma câmara Neubauer em microscópio de contraste de fase ($p= 0,001782$; *test t* de Student).

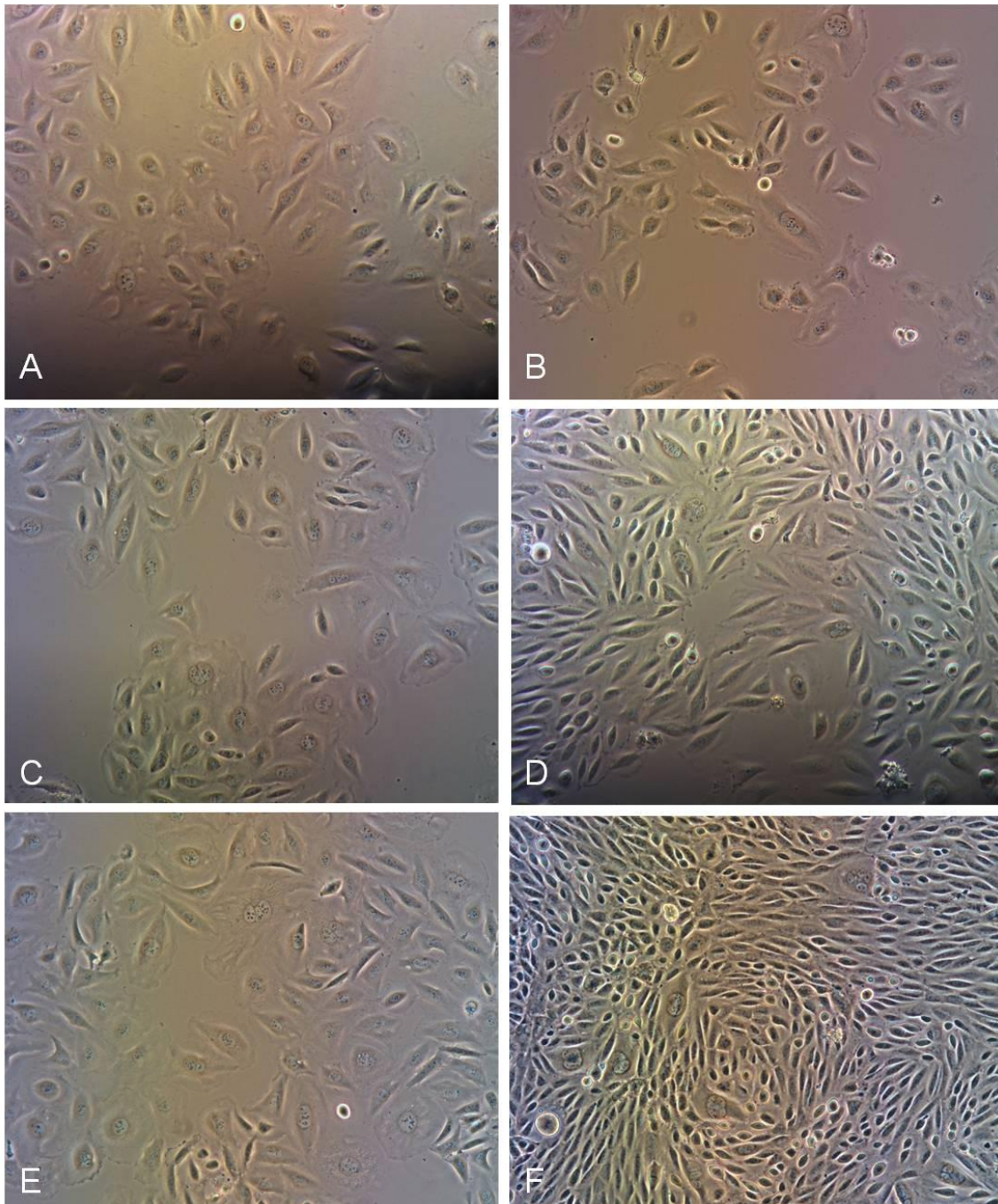


Figura 18: Imagens representativas das células RAEC tratadas ou não com cerulenina. Em **A**, **C** e **E** podemos observar células tratadas com 0,7 µg/ml de cerulenina por 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Uma maior densidade celular pode ser observada nos poços com as células tratadas somente com DMSO (**B**, **D** e **F**). (Microscopia de contraste de fase, aumento original: 100X).

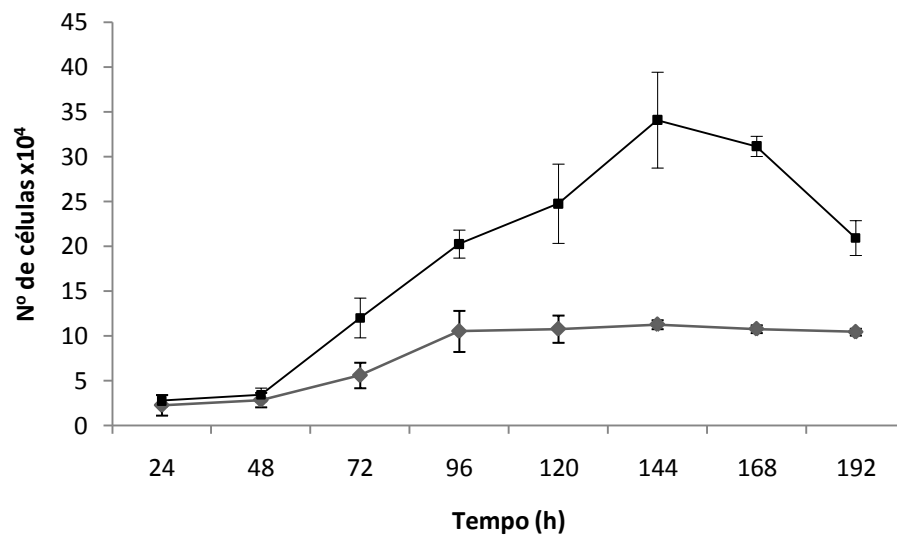


Figura 19: Redução na taxa de crescimento das células RAEC obtida pelo tratamento com 100 μ M de orlistat. As células foram cultivadas na presença de orlistat (◆) ou quantidades equivalentes do veículo etanol (■) por um período de até 192 h. Para a contagem do número de células utilizou-se uma câmara Neubauer em microscópio de fase ($p=0,029$; *test t* de Student).

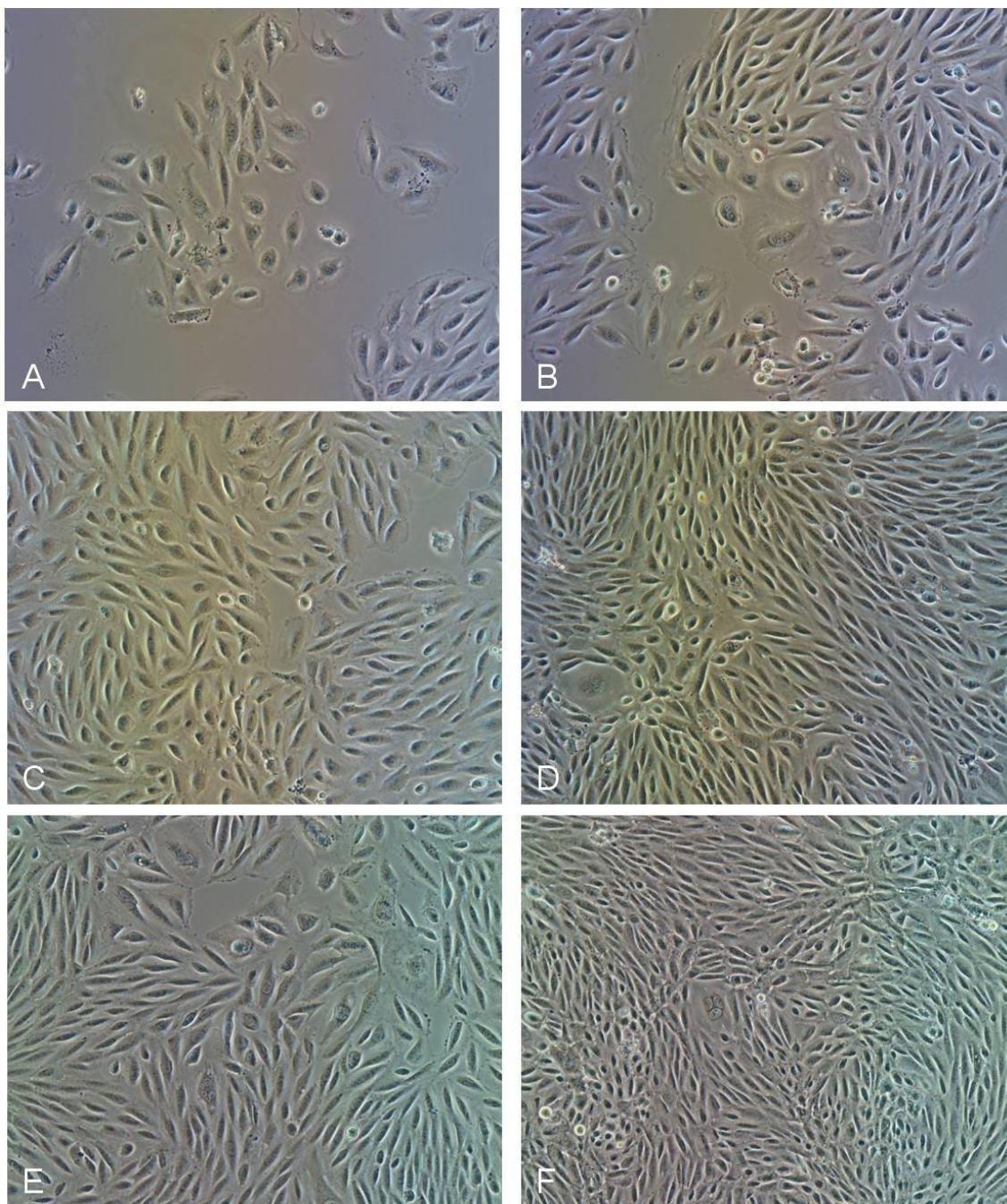


Figura 20: Imagens representativas das células RAEC tratadas ou não com orlistat. Em **A**, **C** e **E** pode-se observar células tratadas com 100 μM de orlistat por períodos de 48, 72 e 96 horas respectivamente. Uma maior quantidade de células está presente nos poços de cultura tratadas somente com o veículo etanol (**B**, **D** e **F**). (Microscopia de contraste de fase, aumento original: 100X).

5.6. Efeito de produtos secretados pelas células de melanoma B16F10 sobre a proliferação das células endoteliais em cultura

No intuito de verificarmos o efeito de proteínas produzidas e secretadas pelas células de melanoma B16F10 sobre a proliferação das células endoteliais RAEC, realizamos a incubação destas últimas com meio RPMI suplementado com 10% de FBS previamente condicionado por um período de 24 h por aproximadamente 5×10^4 células B16F10. A Figura 21 mostra que a incubação das células endoteliais em meio contendo 50% de meio condicionado por períodos de 48 ou 72 horas, provocou aumento na proliferação em 72 h, em comparação com o controle. Nas Figuras 21 e 22, podemos observar o efeito obtido pela exposição das células RAEC em meio de cultura contendo 80% de meio condicionado, por períodos de 48, 72 e 96 horas. O crescimento celular foi acentuado, mesmo no período de 48 h que não exibiu diferença no ensaio mostrado na Figura 21.

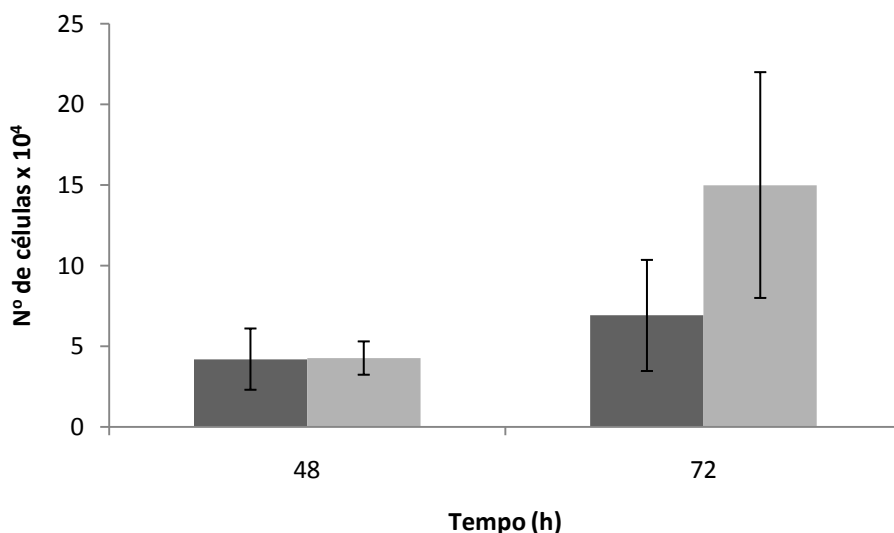


Figura 21: Efeito do meio condicionado (50%) por células de melanoma murino B16F10 (barras claras) sobre a proliferação das células RAEC, em comparação aos controles (barras escuras) tratados com meio metabolizado pelas próprias células RAEC. As células foram contadas em citômetro de fluxo com auxílio do programa CellQuest.

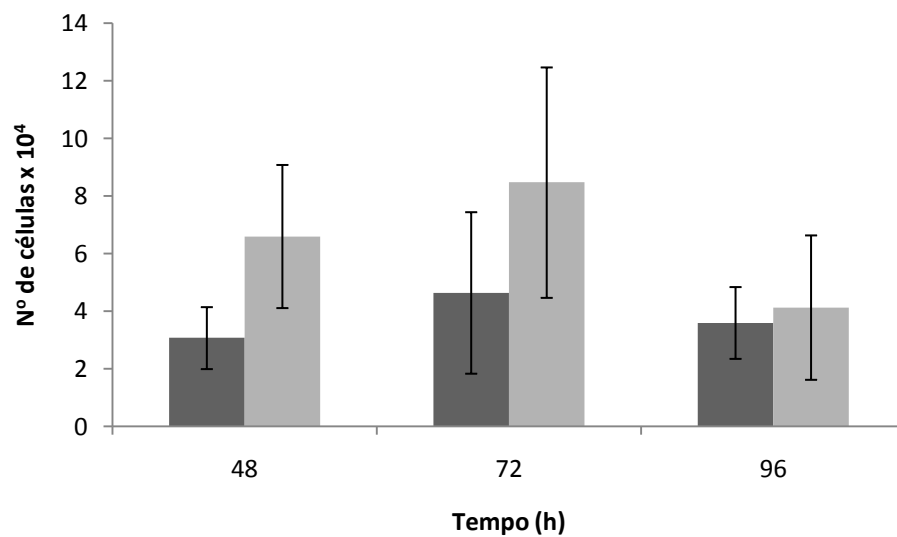


Figura 22: Gráfico de barras mostrando o efeito da incubação com meio contendo 80% de meio condicionado por células de melanoma sobre a proliferação das células RAEC nos períodos de 48, 72 e 96 horas, em comparação aos controles (barras escuras) tratados com meio metabolizado pelas próprias células RAEC. Para a contagem do número de células utilizou-se o programa CellQuest em um citômetro de fluxo ($p < 0,05$; *test t* de Student).

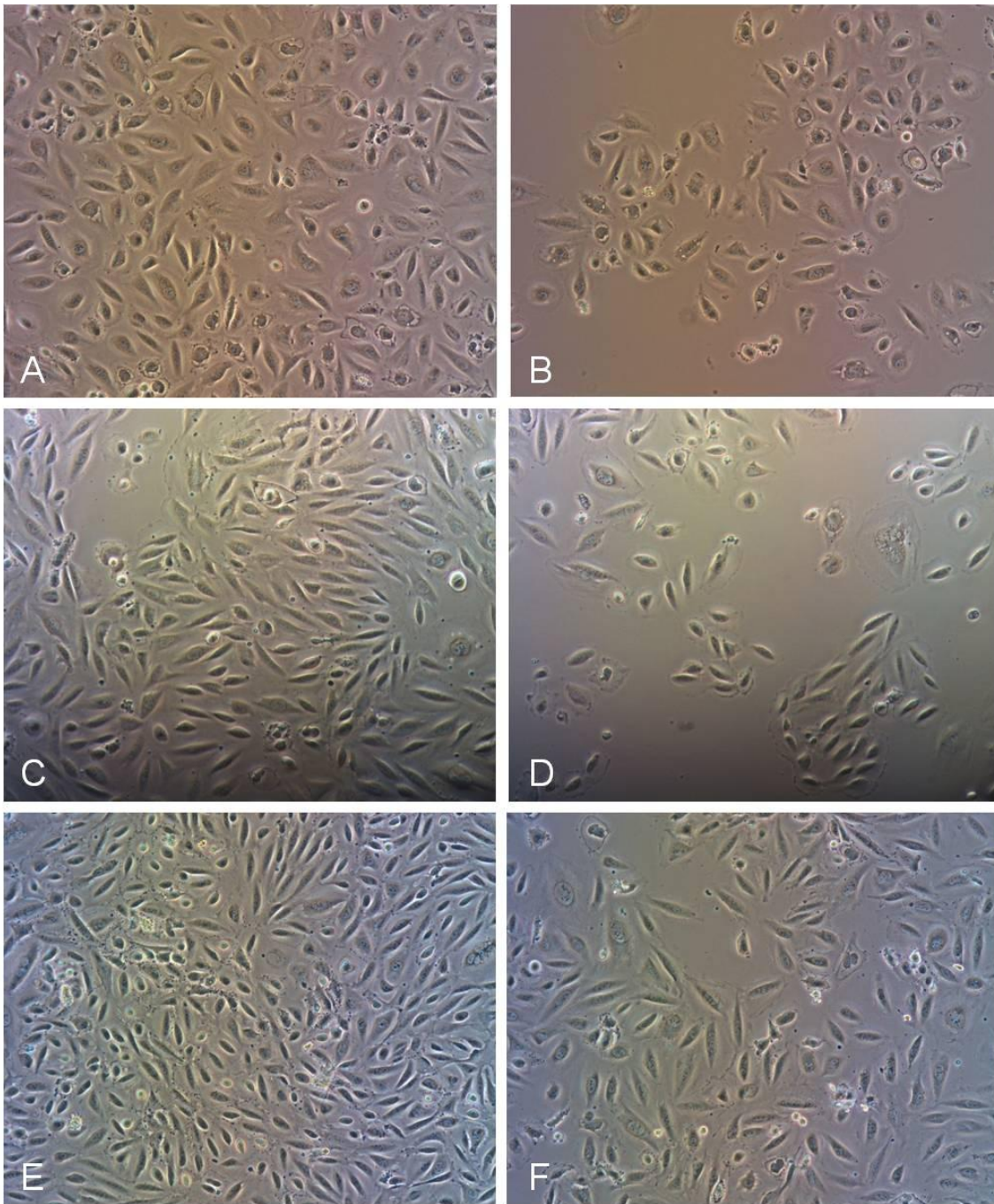


Figura 23: Imagens representativas do efeito do meio condicionado por células de melanoma murino (80%) sobre a proliferação das células RAEC nos períodos de 48, 72 e 96 horas (**A, C e E**) em comparação aos controles (**B, D e F**), tratados com meio metabolizado pelas próprias células RAEC. Podemos observar um nítido aumento da quantidade de células, principalmente nos períodos 48, 72 e 96 horas em comparação aos controles (Microscopia de contraste de fase, aumento original: 100X).

5.7. Avaliação do efeito do orlistat sobre o ciclo celular das células RAEC

Para avaliarmos o efeito da inibição de FASN com orlistat na distribuição das células RAEC nas fases do ciclo celular, foram realizados experimentos de citometria de fluxo. Como ilustrado na Figura 24, houve uma redução na porcentagem de células na fase S do ciclo celular em comparação com os controles, principalmente no período de 96 h.

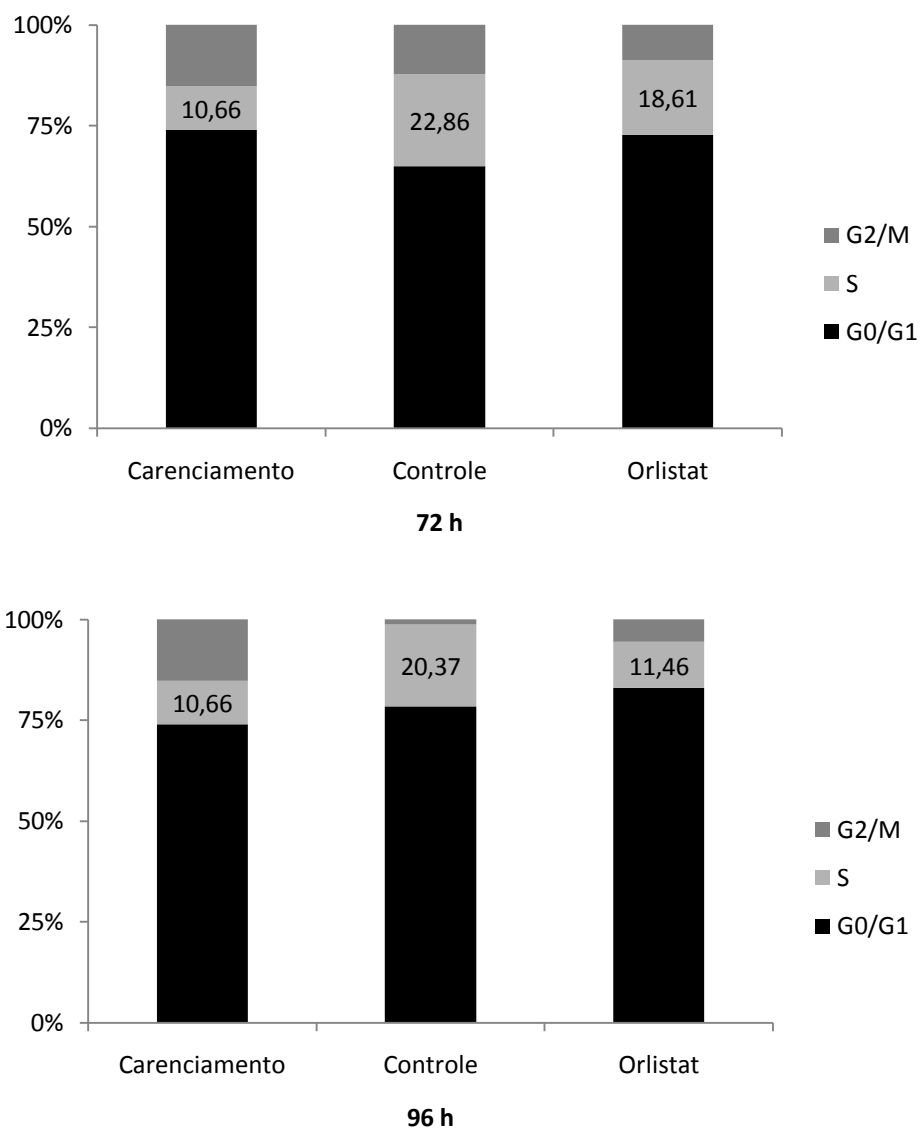


Figura 24: Os gráficos em **A** (72 h) e **B** (96 h) mostram a distribuição das células RAEC nas fases do ciclo celular após tratamento com 100 μ M de orlistat. Podemos observar um gradativo aumento do número de células nas fases G0/G1 concomitante com uma diminuição nas fases S e discreto aumento de G2/M em 96 h ($p= 0,007$; *test t* de Student).

6. DISCUSSÃO

A expressão da enzima FASN vem sendo apontada, na literatura científica recente, como um alvo para a quimioterapia ou até mesmo quimioprevenção de tumores malignos, pois sua expressão é baixa ou mesmo ausente na maioria dos tecidos humanos adultos normais e muito aumentada em diversos tipos de neoplasias malignas humanas (Epstein *et al.*, 1995; Pizer *et al.*, 1998b; Krontiras *et al.*, 1999; Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2000a; Piyathilake *et al.*, 2000; Nemoto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002; Swinnen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Innocenzi *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2003; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004; Kapur, 2005a; Kapur, 2005b; Van de Sande *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Orita *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2008; Orita *et al.*, 2008; Okawa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2009; Uddin *et al.*, 2009; Bershtein 2009; Silva *et al.*, 2009; Kearney *et al.*, 2009). Em vários estudos, têm-se demonstrado uma associação positiva entre a expressão de FASN e um comportamento mais agressivo de algumas destas doenças (Epstein *et al.*, 1995, Alo *et al.*, 1996, Gansler *et al.*, 1997, Kuhajda *et al.*, 2000). Inibidores específicos da sua atividade são capazes de bloquear o ciclo celular, diminuindo assim a proliferação e aumentando a taxa de apoptose em células neoplásicas de próstata, mama, estômago, intestino, endométrio, cavidade bucal, ovário e melanoma (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005; Menendez *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008).

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 morfologicamente normal (Guo *et al.*, 2003). Em melanomas, observou-se uma correlação positiva entre expressão de FASN e índice de Breslow, além de uma correlação inversa entre a presença de FASN e o tempo de sobrevida total (Innocenzi *et al.* 2003). Segundo estes autores, a alta expressão de FASN nestes tumores cutâneos extremamente agressivos parece estar associada

a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e conseqüentemente pior prognóstico.

O fenótipo angiogênico de um tumor é adquirido como conseqüência direta de sua intensa proliferação celular, o que causa um rápido aumento da distância entre as células tumorais e os vasos sanguíneos pré-existentes, o que limita a difusão de oxigênio e nutrientes para as regiões mais internas do tumor e produz um microambiente hipóxico, com acidose e aumento da pressão intersticial (Denko, 2008). Células neoplásicas em hipóxia acumulam o fator indutor de hipóxia (HIF-1 α), que por sua vez, estimula a formação de novos vasos e conseqüente re-oxigenação tecidual através da transcrição de VEGF e do aumento da expressão de seus receptores nas células endoteliais pré-existentes nas proximidades do tumor (revisado por Dewhirst *et al.*, 2008). Embora a expressão do HIF-1 α esteja correlacionada com a hipóxia tecidual, há evidências de que este fator está também implicado em funções biológicas que requerem sua ativação em condições normóxicas (revisado por Semenza, 2003). As principais funções do VEGF são promover a sobrevivência e induzir a proliferação, migração e invasão de células endoteliais na matriz extracelular, contribuindo para o processo de angiogênese através da interação com receptores de superfície tipo tirosina-quinase (Norrby *et al.*, 2006). De maneira geral, os vasos neoformados via VEGFA são desorganizados e apresentam alto número de fenestrações (Cao *et al.*, 2004).

O gene *VEGFA* codifica várias isoformas que diferem entre si pela quantidade de exons, propriedades biológicas e padrão de expressão. O crescimento e desenvolvimento dos vasos sanguíneos em tumores é dependente do balanço da produção de isoformas de VEGFA, que é controlada pelo splicing do seu RNA mensageiro. Foram descritas até o momento 12 isoformas de VEGFA, divididas em duas famílias, as pró-angiogênicas (7 variantes) e anti-angiogênicas (5 variantes), que diferem em seis aminoácidos na porção carboxi-terminal. As variantes anti-angiogênicas são formadas a partir de um splicing distal no exon 8, em um sítio denominado *distal site splice* (DSS), enquanto que as pró-angiogênicas, no sítio proximal do exon 8 chamado *proximal site splice* (PSS).

Estas alterações resultam em mudanças na interação destas moléculas com seus receptores e conseqüentemente na sua função (revisado por Harper & Bates, 2008). O controle molecular que regula a escolha do splice carboxi-terminal (pró ou anti-angiogênico) é ainda pouco conhecido e aparentemente determinado por fatores de splicing específicos regulados por IGF (para o PSS) ou TGF β 1 (para o DSS) (Nowak *et al.*, 2008). Em geral, os experimentos para estudar a expressão de VEGFA não são capazes de detectar as diferenças entre as famílias pró ou anti-angiogênicas destas moléculas. Entretanto, naqueles estudos que fazem esta diferenciação, a expressão de VEGFA foi alta em melanoma e carcinomas colorretal e de bexiga (Cui *et al.*, 2004; Varey *et al.*, 2008; Gopi *et al.*, 2008). Ainda neste contexto, Varey *et al.* (2008) encontraram, através de reações de PCR e ELISA, que a variante VEGFAb compreende 90% dos mensageiros para VEGFAs em tecidos normais e que as isoformas pró-angiogênicas são expressas em câncer colorretal.

Em recente estudo realizado por nosso grupo (Carvalho *et al.*, 2008), células B16F10 foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos C57Bl6 e resultaram na formação de metástases em linfonodos mediastínicos em todos os casos. Um dos resultados mais importantes deste estudo foi que o tratamento destes animais com orlistat reduziu pela metade o número de linfonodos metastáticos. Em um outro trabalho recente, realizado por nosso grupo (Bastos, 2009), foi mostrado que a inibição de FASN com orlistat aumentou a extensão e a ramificação dos vasos linfáticos em orelhas de camundongos C57Bl6 portadores de melanomas experimentais. Neste mesmo estudo, a inibição de FASN diminuiu o volume de linfonodos metastáticos e a produção de VEGFR-3 nos tumores primários. Uma possível explicação para este aumento na densidade de vasos linfáticos é que o bloqueio de FASN pode ter modificado a permeabilidade dos vasos pré-existentes e aumentado a eficiência de captação do marcador fluorescente utilizado.

No presente trabalho, a inibição da atividade de FASN causou significativa redução na extensão e ramificação dos vasos sanguíneos localizados na periferia de melanomas experimentais na pele ventral de camundongos C57Bl6. Até o

momento, apesar de inúmeros estudos envolvendo processos de neoformação vascular, esta é a primeira demonstração “*in vivo*” de que a inibição de FASN altera o fenômeno de angiogênese tumoral. Os mecanismos biológicos responsáveis pela redução na densidade dos vasos sanguíneos podem estar relacionados com os achados de Browne *et al.* (2006), que demonstraram que orlistat inibe a atividade de FASN em células endoteliais humanas (HUVEC) por bloquear a síntese de ácidos graxos e, conseqüentemente, reduz a proliferação. Além disso, os mesmos autores observaram que esta droga inibe a neovascularização em ensaio *ex vivo*, uma vez que previne a expressão de VEGFR-2 na superfície das células endoteliais de vasos sanguíneos.

O fator VEGFA tem alta expressão na grande maioria dos tumores humanos (Ferrara *et al.*, 1997), incluindo o melanoma (Potgens *et al.*, 1995; Rennel *et al.*, 2008). Para investigar a possível relação entre a expressão de VEGFA e o bloqueio de FASN utilizamos experimentos de RT-PCR. Nestes, observamos que VEGFA é expresso na maioria dos melanomas experimentais, no entanto, foram os tumores do grupo tratado com orlistat que apresentaram as maiores quantidades destes RNAs mensageiros. Estes achados estão em concordância com o estudo realizado por Menendez *et al.* (2005), no qual a inibição específica da atividade de FASN com c75 ocasionou um aumento maior que 500% na produção de VEGF-A em células derivadas de câncer de mama com alta expressão de ErbB2. Nestas células, o bloqueio da atividade de FASN ativou substancialmente a via MAPK e causou um acúmulo de HIF-1 α . Estes achados levaram os autores a sugerir que a inibição do metabolismo endógeno de ácidos graxos nas células tumorais desencadeia uma reação semelhante ao que ocorre em condições de hipóxia, que recupera a cascata MAPK-HIF-1 α -VEGF, dependente de ErbB2.

De acordo com a literatura, a expressão das isoformas de VEGFA é variável em neoplasias malignas, sendo que o splicing de VEGFA é dinâmico, tanto em tecidos normais como em células malignas (Ferrara *et al.*, 2003; Grunstein *et al.*, 2000). Em melanoma é a isoforma VEGF121 que parece predominar (Potgens *et al.*, 1995; Redondo *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002). No presente trabalho, encontramos a expressão de RNAs mensageiros para as

isoformas 188, 144 e 120 em melanomas experimentais, sendo a isoforma 188 a mais expressa, seguida pelas isoformas 144 e 120. Neste contexto, Cheung *et al.* (1998) mostraram que em carcinoma pulmonar a progressão maligna está associada com forte expressão de VEGF189. A expressão forçada de VEGF121 e VEGF165 em células derivadas de melanoma humano em estágio inicial resultou em um crescimento agressivo, em comparação com células transfectadas com VEGF189, que não foram tumorigênicas (Yu *et al.*, 2002). Grunstein *et al.* (2000) demonstraram através de células geneticamente modificadas que expressavam especificamente apenas uma isoforma de VEGFA, que a variante 120 foi eficiente na formação vasos periféricos ao tumor e produziu pobre vascularização intratumoral. Já a isoforma 164 foi capaz de induzir eficientemente a formação tanto de vasos na periferia quanto dentro dos tumores e a isoforma 188 levou a formação de densa rede de vasos intratumorais acompanhada de pobre vascularização periférica.

O tratamento com orlistat não modificou expressão de RNAs mensageiros para FASN nos tumores estudados, o que está de acordo com Browne *et al.* (2006), que mostraram que orlistat inibe a atividade de FASN em células endoteliais HUVEC sem alterar a produção desta enzima. Em nosso trabalho anterior (Carvalho *et al.*, 2008), os níveis protéicos de FASN em melanomas intraperitoneais experimentais de camundongos aumentaram depois da inibição com orlistat, pois a falta de atividade pode ter gerado como resposta um aumento na transcrição ou mesmo a estabilização da proteína FASN, com aumento da sua meia-vida.

As diferenças observadas neste trabalho com relação a extensão e densidade dos vasos sanguíneos nos animais tratados com orlistat foram muito nítidas e, como mencionado anteriormente, podem ser atribuídas a redução da proliferação das células endoteliais, apesar do aumento da expressão de VEGFA pelas células tumorais. Experimentos com cultura de células endoteliais RAEC mostraram uma significativa redução da proliferação na presença dos inibidores específicos de FASN orlistat ou cerulenina, o que foi confirmado através de análises feitas em citômetro de fluxo. Segundo Browne *et al.* (2006), apenas 15

μM de orlistat provocou a morte de células endoteliais HUVEC estimuladas por VEGF. Esta concentração mais baixa da droga provavelmente se deve ao estímulo proliferativo causado por VEGFA, o que provoca uma maior necessidade da síntese endógena de ácidos graxos para compor a membrana destas células. Outros inibidores de FASN, 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; Heiligtag *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2008). Neste trabalho, demonstramos por RT-PCR que a linhagem B16F10 expressa RNAs mensageiros para VEGFA e que a incubação das células endoteliais RAEC com meio condicionado pelas primeiras resulta em aumento da proliferação. Este fato sugere fortemente que o fator VEGFA secretado pelas células B16F10 seja o responsável pela angiogênese peritumoral observada em nossos experimentos.

Em resumo, os resultados aqui apresentados mostram que a inibição de FASN pelo tratamento com orlistat reduz a extensão e ramificação dos vasos sanguíneos na periferia dos melanomas experimentais implantados no ventre dos camundongos C57Bl6. Além do mais, a inibição da FASN aumenta a produção de VEGFA nos tumores e promove o bloqueio do ciclo celular nas células endoteliais RAEC.

7. CONCLUSÕES

- 7.1. A angiogênese induzida pelo implante intradérmico de células B16F10 foi significativamente reduzida pela inibição da FASN com orlistat.
- 7.2. A quantidade relativa dos RNAs mensageiros para FASN nos tumores foi semelhante entre os grupos tratados ou não com orlistat.
- 7.3. A quantidade de RNAs mensageiros para VEGFA é aumentada pela inibição da FASN com orlistat nos melanomas experimentais.
- 7.4. A expressão da isoforma 188 de VEGFA foi encontrada em maior quantidade nos tumores do grupo tratado e no controle.
- 7.5. O tratamento das células RAEC com inibidores de FASN reduz a sua proliferação.
- 7.6. A incubação das células RAEC com meio previamente condicionado por B16F10 aumentou a sua proliferação.

BIBLIOGRAFIA

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

-Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DM. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res.* 2005 Dec1;65(23):10637-41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, and Oldfield EH. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J. Clin. Investig*. 1993; 91: 153–159.

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

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

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

-Bott RC, McFee RM, Clopton DT, Toombs C, Cupp AS. Factor and Kinase Domain Region Receptor Are Involved in Both Seminiferous Cord Formation and Vascular Development During Testis Morphogenesis in the Rat. *Biology of Reproduction* 75, 56–67 (2006)

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

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

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

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

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

-Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, Deberardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL, Thompson CB. The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed

by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene*. 2005 Jun 16;24(26):4165-73.

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

-Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, and Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat. Med.*, 5: 495–502, 1999.

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

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

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

-Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, et al. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer*. 2008 Dec 1;123(11):2557-65.

-Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B, Javierre B, Carolyn JM, Michael R. Emmert-Buck, Green JE, Baker CC and Calvo A. Increased expression of VEGF121/VEGF165–189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis *Int. J. Cancer* 2007 : 120, 2096–2109

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M. *Braf*V600E cooperates with *Pten* loss to induce metastatic melanoma. Nature Genetics, vol 41 No 5, May 2009

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

-Einspahr JG, Thomas TL, Saboda K, Nickolof BJ, Warneke J, Curiel-Lewandrowski C, Ranger-Moore J, Duckett L, Bangert J, Fruehauf JP, Alberts DS. Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression. *Cancer*. 2007 Dec 1;110(11):2519-27.

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

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

-Evan GI, Vousden KH Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):342-8.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-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.

-Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Kamada S, Saito K, Iizumi M, Liu W, Ericsson J, Watabe K. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res* 2008 68: 1003–1011

-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.

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

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

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

-Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ, Lechpammer M, Huesken D, Zimmermann J, Signoretti S, Loda M. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell* 2004 5: 253–261

-Gray-Schopfer VC, da Rocha Dias S e Marais R. The role of B-RAF in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 **24**, 165–183

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

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

-Hayward, N.K. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* **22**, 3053–3062(2003).

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

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

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

-Horiguchi A, Asano T, Asano T, Ito K, Sumitomo M, Hayakawa M. Fatty acid synthase over expression is an indicator of tumor aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. *J Urol.* 2008 Sep;180(3):1137-40. Epub 2008 Jul 18.

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

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

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

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

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

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

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

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

-Kamphaus, G. D. *et al.* Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Biol. Chem.* 2000 **275**, 1209–1215.

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

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

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

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

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

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

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

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

-Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem* 2004; 279 (29): 30540-30545.

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

-Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 1999 Apr 1;59 (7 Suppl):1693s-1700s.

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

-Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE et al. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; 21 (4): 325-329.

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

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

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

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

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

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

-Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem.* 2001; 276(15): 11512-6.

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

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

-Leyon PV, Kuttan G. Effect of *Tinospora cordifolia* on the cytokine profile of angiogenesis-induced animals. *Int Immunopharmacol.* 2004 Dec 15;4(13):1569-75.

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

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

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

-Lin, W.M. *et al.* Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. *Cancer Res.* 2008 **68**, 664–673.

-Little JL, Wheeler FB, Fels DR, Koumenis C, Kridel SJ. Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res* 2007 **67**: 1262–1269

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-Menendez JA, Vellon L, Ruth L. Orlistat: From antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB2)-overexpressing gastrointestinal tumors? *Society Exp Biol Med* 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 trastuzumab (Herceptin) in chemoresistant ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 219-221.

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

-Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of humannaevi. *Nature* 2005 **436**, 720–724.

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

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

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

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

-Munaron L. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2006 Jan;1(1):105-19. Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis.

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

-National Cancer Institute– Câncer Statistics: melanoma 2009, disponível em: URL: <http://www.cancer.gov/statistics> [acessado 2009 Jun. 09].

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

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

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

-Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D'Amore PA. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev. Dyn.*, 2001 220: 112–121.

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

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

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

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

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

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

-Omura T, Miyazawa K, Ostman A, Heldin CH. Identification of a 190-kDa vascular endothelial growth factor 165 cell surface binding protein on a human glioma cell line. *J. Biol. Chem.* 1997 272: 23317–23322.

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

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

-Orita H, Coulter J, Lemmon C, Tully E, Vadlamudi A, Medghalchi SM, Kuhajda FP, Gabrielson E. Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 1;13(23):7139-45. Epub 2007 Dec 3.

-Orita H, Coulter J, Tully E, Kuhajda FP, Gabrielson E. Inhibiting fatty acid synthase for chemoprevention of chemically induced lung tumors. *Clin Cancer Res.* 2008 Apr 15;14(8):2458-64.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-Pollock, P.M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* **33**, 19–20(2003).

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

-Poltorak, Z., Cohen, T., and Neufeld, G. The VEGF splice variants: properties, receptors, and usage for the treatment of ischemic diseases. *Herz*, 25: 126–129, 2000.

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

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

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

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

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

-Rennel ES, Waine E, Guan H, Schu"ler Y, Leenders W, Woolard J, Sugiono M, Gillatt D, Kleinerman ES, Bates DO, Harper SJ. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice *British Journal of Cancer* 2008 98, 1250 – 1257

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-Silva SD, Cunha IW, Rangel AL, Jorge J, Zecchin KG, Agostini M, Kowalski LP, Coletta RD, Graner E. Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. *Virchows Arch.* 2008 Jul;453(1):57-67. Epub 2008 Jun 6.

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

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

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

-Stimpfl M, Tong D, Fasching B, Schuster E, Obermair A, Leodolter S, et al. Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:2253–9.

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

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

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

-Sviderskaya EV. *et al.* p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002 **94**, 446–454.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2004 **122**, 337–341.

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

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

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

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

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

-Van de Sande, T., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G. e Swinnen, J. V. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002 62, 642-6.

- Varey, A. H. *et al.* VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of

pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. 2008 *Br. J. Cancer* **98**, 1366–1379.

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

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

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

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

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

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

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

-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.

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

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

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

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

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

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

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

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

-Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waite E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, Bates DO. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splicevariant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 2004 64: 7822–7835

-Yancopoulos GD, et al., Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. 2000 *Nature* 407, 242-248

-Yehudit Kraizer, Nidal Mawasi, Jane Seagal, Melia Paizi, Nimer Assy, and Gadi Spira, Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin in Liver Regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001 **287**, 209–215

-Yorimitsu T, Klionsky DJ. Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol.* 2007 Jun;17(6):279-85.

-Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, et al., Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor

in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 1997 Jul;17(7):4015-23

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

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

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

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



CEEA/Unicamp

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1773-1, sobre "Estudo *in vivo* do papel biológico da enzima ácido graxo sintase (FAS) na angiogênese induzida por melanoma murino", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edgard Graner / Fabiana Seguin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 16 de março de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1773-1, entitled "*In vivo* study of the fatty acid synthases (FASN) a activity in the angiogenesis induced by murine melanoma", 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 March 16, 2009.

Campinas, 16 de março de 2009.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva