



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



ROSE MARA ORTEGA

Cirurgiã-dentista

***Regulação do ciclo celular após inibição  
farmacológica da enzima ácido graxo sintase em  
linhagem derivada de melanoma murino, B16-F10***

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Gottardello Zecchin

PIRACICABA

2010

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

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª. / 8099

Or8r Ortega, Rose Mara.  
Regulação do ciclo celular após inibição farmacológica da enzima ácido graxo sintase em linhagem derivada de melanoma murino, B16-F10 / Rose Mara Ortega. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Karina Gottardello Zecchin.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Câncer. 2. Cerulenina. 3. Prognóstico. 4. Ciclinas. I. Zecchin, Karina Gottardello. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.  
(eras/fop)

Título em Inglês: Cell cycle regulation after pharmacological inhibition of the enzyme fatty acid synthase in murine melanoma line derived from, B16-F10

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Cancers. 2. Cerulenin. 3. Prognosis. 4. Cyclins

Área de Concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatologia

Banca Examinadora: Karina Gottardello Zecchin, Elaine Maria Sgavioli Massucato e Ricardo Della Coletta

Data da Defesa: 27-07-2010

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 27 de Julho de 2010, considerou a candidata ROSE MARA ORTEGA aprovada.

*Karina Zecchin*

---

Profa. Dra. KARINA GOTARDELLO ZECCHIN

*Elaine Maria Sgavioli Massucato*

---

Profa. Dra. ELAINE MARIA SGAVIOLI MASSUCATO

*Ricardo Della Coletta*

---

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

## ***DEDICATÓRIA***

---

---

*Aos meus pais, **José Carlos** e **Antonina**, pelo amor, dedicação e principalmente apoio em minha caminhada.*

***Pai** a educação e os valores de humanidade e humildade que me ensinou são sempre admirados!*

***Mãe** teu amor me guia e me fortalece!*

*As minhas irmãs **Tânia** e **Carla** pelo incentivo e companheirismo.*

*Ao meu irmão e cunhado **Caio** pelo apoio.*

*Aos meus sobrinhos **Ana Carolina**, **Caio** e **Luca**, pela presença que torna tudo mais alegre!*

*A minha orientadora **Professora Dra. Karina Gottardello Zecchin***

***Karina você me apresentou um caminho até então desconhecido  
e me conduziu por este caminho com tamanha maestria  
que tornou tudo mais suave.***

***Quero registrar aqui meu sincero agradecimento pela maneira com que me  
orientou, pela dedicação, paciência e sabedoria.***

Não sei... Se a vida é curta  
Ou longa demais pra nós,  
Mas sei que nada do que  
vivemos  
Tem sentido, se não tocamos o  
coração das pessoas.

Cora Coralina

## ***AGRADECIMENTOS***

---

---

Este trabalho foi 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, por sua orientação não só como coordenador, mas também diretamente como pesquisador;

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

Ao **Prof. Dr. Edgard Graner**, pela orientação direta ou indireta de minha pesquisa;

Ao **Prof. Dr. Anibal Vercesi**, por ter permitido que eu participasse das atividades no Laboratório de Bioenergética da FCM-UNICAMP;

Às **Prof. Dra. Helena C.F. Oliveira** e sua aluna de doutorado **Helena F. Raposo**, do Laboratório de Lípidos do IB-UNICAMP, pela colaboração nos experimentos de lipogênese;

Aos amigos do laboratório em Campinas Ana Catarina, Carlos, Daniela, Edilene, Elisângela, Felipe, Juliana, Luciane, Márcia, Mariana, Paolo, Roberto, Rute, Thiago e em especial aos amigos Carina Malaguti por ter me recebido carinhosamente em sua casa e Franco A. Rossato por todo ensinamento e ajuda;

Aos amigos do laboratório de Piracicaba Fabiana, Débora, Lays, Livia, Luciana, Manoela, Marco, Michelle, Sibeles e, em especial, à amiga Andréia Bufalino pela amizade consolidada;

Aos demais amigos de pós-graduação Ana Lúcia, Ana Terezinha, Alan, Adriele, Bruno, Carolzinha, Daniel, Fernanda, Juliana, Jorge, Katya, Marco, Mário, Marisol, Patrícia, Renato, Rogério, Tânia, Wilfredo e Victor

Aos demais funcionários do laboratório de patologia Ana Paula, Adriano, Fabiana, Geovania, Luana e João;

Por fim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

## *EPIGRÁFE*

---

---

“Aprendi com a primavera; a deixar-me cortar e voltar sempre inteira”

Cecília Meireles

## ***RESUMO***

---

---

Ácido graxo sintase (FASN - *fatty acid synthase*) é a enzima metabólica responsável pela síntese endógena do ácido graxo saturado palmitato, a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA. Diversos estudos mostram que, em contraste com a maioria das células normais, FASN é altamente expressa em vários tipos de neoplasias malignas humanas, tais como as de próstata, mama e melanoma sendo que, em alguns destes tumores, a alta expressão de FASN está associada a um pior prognóstico. Anteriormente demonstramos que a inibição específica da atividade de FASN reduz significativamente a proliferação celular e promove a apoptose em linhagem celular de melanoma murino, B16-F10. O objetivo deste trabalho foi investigar de que maneira a inibição farmacológica de FASN reduz a proliferação de células B16-F10, utilizando a cerulenina, um produto natural do fungo *Cephalosporium caerulens*, como inibidor de FASN. O tratamento com cerulenina reduziu significativamente a proliferação das células B16-F10 de maneira dose-dependente. Ensaios de lipogênese utilizando  $^3\text{H}_2\text{O}$  confirmaram a inibição da atividade de FASN pelo tratamento com cerulenina. Tal inibição resultou em significativo bloqueio da proliferação, conforme evidenciado pelo aumento do número de células nas fases G0/G1, assim como redução de células na fase S, em comparação com os controles. Paralelamente, o tratamento com cerulenina também aumentou o número de células em apoptose. Western blottings, feitos a partir de extratos de células tratadas com cerulenina, mostraram aumento significativo da proteína supressora de tumor p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, assim como redução de cdk2, uma Ser/Thr necessária para a transição G1/S, e Skp2, uma proteína necessária para a degradação proteossômica de p27<sup>Kip1</sup>. Apesar de não ter alterado o conteúdo total de p27<sup>Kip1</sup>, a inibição de FASN aumentou a quantidade de p27<sup>Kip1</sup> co-imunoprecipitada com cdk2. Por outro lado, o tratamento com cerulenina não alterou o conteúdo de outras proteínas envolvidas na progressão das fases G1-S do ciclo celular, tais como cdk4, cdk6, Rb total, ciclina D1 e ciclina E. Em conjunto estes resultados demonstram que a inibição de FASN primeiramente altera os níveis de proteínas envolvidas na transição de G1 para S, tais como p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> e Skp2, e posteriormente induz apoptose em células de melanoma murino B16-F10. Palavras-chave: câncer, cerulenina, prognóstico e ciclinas.

## ***ABSTRACT***

---

---

Fatty acid synthase (FASN) is the metabolic enzyme responsible for the endogenous synthesis of the saturated long-chain fatty acid palmitate, from the precursors acetyl-CoA and malonyl-CoA. In contrast to most normal cells, the overexpression of FASN in several human malignancies, such as those of prostate, breast, ovary, melanoma, and soft tissue sarcomas has been associated with poor prognosis. We have previously shown that the specific inhibition of FASN activity significantly reduce proliferation and promote apoptosis in the mouse metastatic melanoma cell line B16-F10. Here we investigated the events involved in cell cycle arrest subsequent to pharmacological FASN inhibition with cerulenin, a natural antifungal antibiotic obtained from *Cephalosporium caerulens*, in B16-F10 cells. Cerulenin treatment significantly reduced melanoma cells proliferation in a dose dependent manner. Lipogenesis using  $^3\text{H}_2\text{O}$  confirmed inhibition of FASN activity after cerulenin treatment. Such enzymatic inhibition culminated in cell cycle arrest, evidenced by a significant increase in G0/G1 phase, as well as decline of the S phase, in comparison with untreated cells. Cerulenin treatment also induced apoptosis in B16-F10 tumor cells. Western blotting analysis of cerulenin-treated cells showed a significant accumulation of the tumor suppressor proteins p21<sup>WAF1/Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>, together with decreased amounts of cdk2, a Ser/Thr protein kinase necessary for the G1/S transition, and Skp2, essential for the proteasomal degradation of p27<sup>Kip1</sup>. Cerulenin treatment increased the levels of p27<sup>Kip1</sup> co-immunoprecipitated with cdk2, despite western blotting analysis showed similar content of total p27<sup>Kip1</sup>. The levels of other proteins involved in G1/S cell cycle progression, such as cdk4, cdk6, total Rb, cyclins A and E, were not affected by FASN inhibition. Collectively these findings suggest that FASN inhibition first modify the levels of proteins involved in transition G1-S, as p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> and Skp2, to finally induce apoptosis in mouse melanoma B16-F10 cells.

Keywords: cancers, cerulenina, prognosis and cyclins

## ***LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS***

---

---

ATCC: *American Type Culture Collection*

CDK: *Cyclin-Dependent Kinase*

CIP: *Cyclin-dependent kinase Interacting Protein*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: *1,4-Dithiothreitol*

EGF: *Epidermal Growth Factor*

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FASN: *Fatty Acid Synthase*

G0: *Gap 0* - Intervalo 0 (estado de quiescência da célula)

G1: *Gap 1* - Intervalo 1

G2: *Gap 2* - Intervalo 2

INK: *Inhibitor of Kinase*

kDa: Quilodaltons

KIP: *Kinase Inhibitor Protein*

M: Mitose

NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

$\Delta\Psi_m$ : Potencial elétrico de membrana mitocondrial

S: Fase S

SFB: Soro Fetal Bovino

SREBP: *Sterol Regulatory Element Binding Protein*

# *SUMÁRIO*

---

---

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 Ácido graxo sintase (FASN)	3
2.1.1 Regulação da expressão de FASN	6
2.1.2 Inibidores específicos da atividade de FASN	8
2.1.3 Efeitos biológicos da inibição de FASN	8
2.2 Ciclo celular	10
2.2.1 Controle do ciclo celular	13
2.2.2 Regulação da transição de G1 para S em células normais e tumorais	15
2.3 Melanoma	23
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.1 Cultura de células	27
4.2 Preparo da Cerulenina	28
4.3 Citometria de fluxo	28
4.4 Curva de proliferação	29
4.5 Ensaio de viabilidade celular por MTT	29
4.6 Avaliação das taxas de apoptose	30
4.7 Análise do ciclo celular	30
4.8 Lipogênese	31
4.9 Western blotting	32
4.9.1 Obtenção dos extratos protéicos	33

4.9.2 Preparo dos extratos protéicos	34
4.9.3 Dosagem protéica	33
4.9.4 Separação eletroforética de proteínas e western blotting	34
4.10 Co-imunoprecipitações	36
4.11 Análise estatística	37
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>67</b>

# 1 INTRODUÇÃO

---

---

Na década de 1950, alguns estudos mostraram em tecidos tumorais, elevados níveis da enzima ácido graxo sintase (FASN), responsável pela síntese de ácidos graxos saturados (Kuhajda, 2000). No entanto, foi somente a partir da década de 1980 que a regulação da expressão de FASN em tumores malignos foi intensamente investigada, especialmente em linhagens celulares derivadas de câncer de mama (Chalbos *et al.*, 1987).

Devido à alta taxa proliferativa, células neoplásicas malignas utilizam ácidos graxos provenientes da síntese endógena através de FASN para síntese de suas membranas (Ookhtens *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1986; Chirala *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2005a). Desse modo, muitos tumores apresentam aumento da atividade de FASN e diversos trabalhos mostram correlação direta entre aumento da expressão desta enzima e pior prognóstico (Epstein *et al.*, 1995; Gansler *et al.*, 1997; Alo *et al.*, 2000; Kuhajda, 2000; Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2006; Menendez *et al.*, 2007). O tratamento *in vitro* de células derivadas de neoplasias malignas humanas, tais com próstata e estômago, com inibidores de FASN resulta em inibição da proliferação e morte celular (Pizer *et al.*, 1996a; 1996b; 1998; Furuya *et al.*, 1997; Kuhajada *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2004; 2005a). Considerando que (i) grande parte dos ácidos graxos produzidos pelas células tumorais é incorporada aos fosfolípidos de membrana e (ii) a biossíntese destes fosfolípidos é maior entre as fases G1 e S do ciclo celular, a inibição de FASN culmina em acúmulo de células na fase G1, sugerindo forte associação entre o controle do ciclo celular e a atividade de FASN (Menendez *et al.*, 2005b).

O ciclo celular é uma série de eventos coordenados através dos quais a célula duplica todo o seu conteúdo e se divide (Li *et al.*, 2006; Hochegger *et al.*, 2008). A progressão através do ciclo celular envolve a ativação coordenada de proteínas, ciclinas dependentes de quinases (cdks), pela ligação com ciclinas específicas e, dessa maneira, diferentes complexos ciclinas/cdks operam durante as diferentes fases do ciclo celular (Carnero, 2002). Uma série de pontos de checagem previnem que a célula entre em uma fase até que tenha completado com sucesso a fase anterior (Malumbres & Barbacid, 2001). Na fase G1, por exemplo, além dos pontos de checagem, há o ponto de restrição, após o qual a célula está comprometida com o ciclo mesmo que os sinais mitogênicos sejam retirados (Alberts *et al.*, 2004). Desequilíbrios nestes controles podem levar a célula a uma proliferação descontrolada e possível crescimento neoplásico (Malumbres & Barbacid, 2001).

O presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar de que maneira a inibição farmacológica de FASN reduz a proliferação das células de melanoma B16-F10 *in vitro*, através da checagem dos níveis de algumas proteínas envolvidas na transição G1-S do ciclo celular.

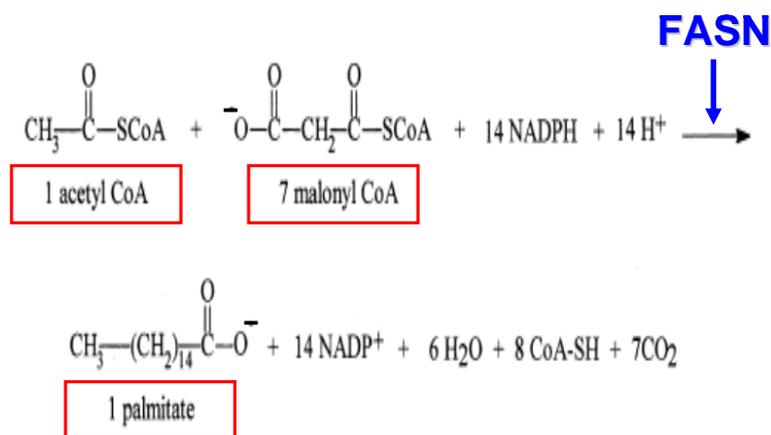
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

---

### 2.1 Ácido graxo sintase (FASN)

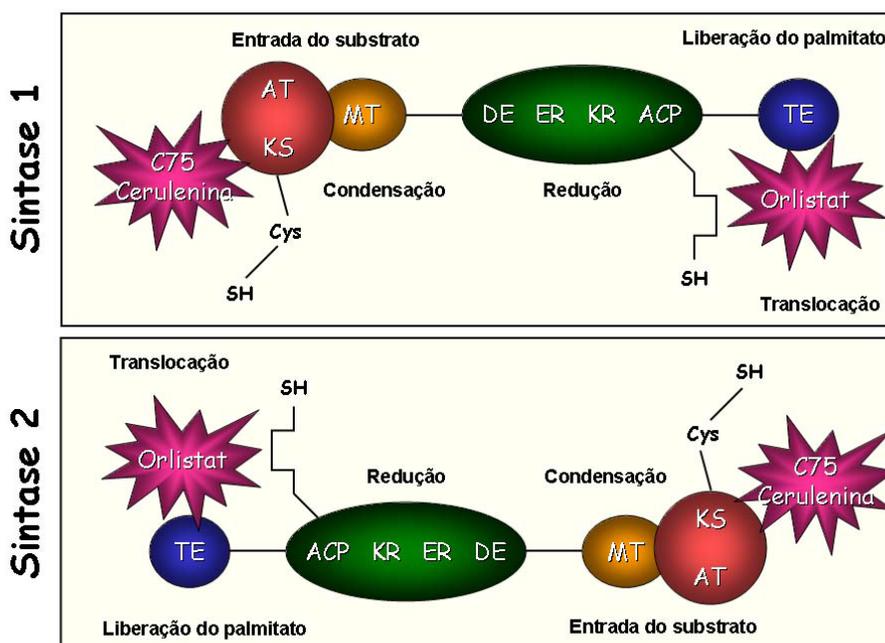
Ácido graxo sintase (*fatty acid synthase* – FASN, EC 2.3.1.85) é a enzima metabólica responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa, mais especificamente o palmitato, a partir dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (**Figura 1**) (Stoops & Wakil, 1981; Tsukamoto *et al.*, 1983; Kuhajda *et al.*, 2000; Chirala *et al.*, 2001; Rangan *et al.*, 2001; Baron *et al.*, 2004).



**Figura 1: Demonstração estequiométrica de FASN**, onde apenas um único acetil-CoA é condensado com malonil-CoA pela enzima ácido graxo sintase, resultando na formação de uma cadeia de dois carbonos. Para a produção final de palmitato, a adição de seis moléculas de malonil-CoA na cadeia em crescimento se faz necessária. Os subprodutos formados são: água, dióxido de carbono e íons positivos de nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato, NADP.

Modificado por Rose M. Ortega a partir de Kuhajda, 2000

Estruturalmente, FASN é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas longas com massa molecular de aproximadamente 270 kDa e meia-vida de 12,2 h (Graner *et al.*, 2004). Esta enzima é formada por sete sítios catalíticos e um sítio para a proteína carregadora de acil (ACP, *acyl carrier protein*), distribuídos a partir da extremidade amino-terminal em direção à carboxil-terminal, de acordo com a seguinte ordem:  $\beta$ -cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transacilases, desidratase, enoil redutase,  $\beta$ -cetoacil redutase, ACP e tioesterase (**Figura 2**) (Wakil, 1989; Smith, 1994; Jayakumar *et al.*, 1995; Brink *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2005b).



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

A expressão de FASN é baixa ou até mesmo ausente em tecidos normais, exceto no fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões de recém-nascidos (Kuhajda *et al.*, 2000; Chirala *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002). A atividade desta enzima também é baixa na maioria dos tecidos normais, exceto os lipogênicos, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos usados pelas células provém da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Baron *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005a). Por outro lado, as células neoplásicas malignas utilizam ácidos graxos provenientes, em grande parte, da síntese endógena através de FASN e diversos são os tumores que apresentam aumento da atividade desta enzima: carcinoma de mama (Milgraum *et al.*, 1997), de ovário (Alo *et al.*, 2000), de próstata (Dhanasekaran *et al.*, 2001; Swinnen *et al.*, 2002; Dowling *et al.*, 2009), de endométrio (Pizer *et al.*, 1998), de tireóide (Vlad *et al.*, 1999), de pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000), de cólon (Visca *et al.*, 1999), de esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), de estômago (Kusakabe *et al.*, 2002; van de Sande *et al.*, 2005), de bexiga (Visca *et al.*, 2003), carcinoma espinocelular bucal (Krontiras *et al.*, 1999; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2008) e sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2006). Além disso, diversos trabalhos demonstraram que a alta expressão de FASN está associada a um pior prognóstico (Epstein *et al.*, 1995; Gansler *et al.*, 1997; Alo *et al.*, 2000; Kuhajda, 2000; Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2006; Menendez *et al.*, 2007). Em melanomas, por exemplo, observou-se que a alta expressão de FASN está associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástase e, conseqüentemente, pior prognóstico (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005). Tais achados são justificados pelo fato de FASN ter grande participação na formação de membranas celulares, uma vez que produz componentes como ácidos graxos e seus derivados (Chirala *et al.*, 2003), os quais também agem como

mensageiros intracelulares e como forma armazenadora de energia (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Desse modo, sua alta atividade proporciona vantagens para o rápido crescimento celular em neoplasias (Baron *et al.*, 2004).

### 2.1.1 Regulação da expressão de FASN

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

Em 1953 mostrou-se aumento da síntese de ácidos graxos em tecidos neoplásicos, em comparação com tecidos normais (Medes *et al.*, 1953). A partir da década de 1980, a regulação da expressão de FASN em tumores malignos começou a ser intensamente investigada, em linhagens celulares de câncer de mama (Chalbos *et al.*, 1987). Atualmente, muitos estudos mostram que, em células neoplásicas malignas, a maior parte dos ácidos graxos é proveniente da biossíntese endógena, de maneira praticamente independente da dieta (Ookhtens *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1986; Menendez *et al.*, 2005a).

Em tumores sensíveis a hormônios, estrógeno, progesterona e andrógenos desempenham um papel claro na regulação de FASN (Kuhajda, 2000). Progesterona estimula a expressão de FASN em linhagens celulares de câncer de mama (Lacasa *et al.*, 2001), enquanto andrógenos e fator de crescimento epidérmico (EGF) aumentam a expressão e a atividade FASN em linhagem celular de câncer de próstata (LNCaP) (Swinnen *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000; Swinnen *et al.*, 2000; Lacasa *et al.*, 2001). Esta regulação parece estar associada ao aumento da expressão de SREBP, cuja forma ativa estimula regiões regulatórias do gene que codifica FASN (Swinnen *et al.*, 1997b; 2000; Heemers *et al.*, 2001). Através da via de sinalização celular PI-3K/Akt, a oncoproteína ErbB2 atua sobre o promotor de FASN, induzindo a síntese de ácidos graxos (Kumar-Sinha *et al.*, 2003), sendo que uma alta expressão e/ou amplificação de ErbB2 está associada com um pior prognóstico para câncer de mama (Yarden, 2001; Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2003). Além disso, a freqüente perda de função do gene supressor de tumor PTEN, pode ativar a via PI-3K/Akt e desempenhar um importante papel na regulação de FASN em células neoplásicas (van de Sande *et al.*, 2002).

### 2.1.2 Inibidores específicos da atividade de FASN

Diversos agentes foram descritos como inibidores de FASN, tais como cerulenina, C75, orlistat, triclosan e alguns polifenóis (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Kridel *et al.*, 2004; Lupu & Menendez, 2006). A cerulenina ([2R, 3S], -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida) é um produto natural do fungo *Cephalosporium caerulens*, descoberto em 1960 por suas propriedades antifúngicas (Hata *et al.*, 1960). Esta droga inibe irreversivelmente a atividade de FASN por se ligar covalentemente ao sítio  $\beta$ -cetoacil sintase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (Figura 2) (Kuhajda *et al.*, 2000). Devido a sua instabilidade, o uso como agente anti-lipogênico é restrito (Omura, 1976; Loftus *et al.*, 2000), porém seu análogo sintético, C75, é mais estável e apresenta melhores efeitos *in vivo* (Kuhajda *et al.*, 2000). Recentemente foi descrito que a droga orlistat (tetrahidrolipstatina, Xenical<sup>®</sup>, Roche, EUA), um derivado semi-sintético da lipstatina, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) para o tratamento da obesidade por inibir irreversivelmente as lipases gástricas e pancreáticas no interior do trato gastrointestinal (Guerciolini, 1997; Lupu & Menendez, 2006), também age como inibidor específico e irreversível do sítio catalítico tioesterase de FASN, o qual é responsável pela liberação do palmitato pela ACP (Figura 2) (Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005b).

### 2.1.3 Efeitos biológicos da inibição de FASN

Foi demonstrado previamente que o tratamento com cerulenina, C75 ou orlistat inibe a progressão do ciclo celular e induz morte celular em diversas neoplasias malignas humanas, tais como mama, próstata e estômago (Pizer *et al.*, 1996a;1996b; 1998; Furuya

*et al.*, 1997; Kuhajada *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2004; 2005a). Em estudo recente foi demonstrado que a cerulenina é também capaz de inibir o crescimento de fibroblastos gengivais humanos normais em culturas primárias (Almeida *et al.*, 2005), assim como o orlistat reduz a taxa de proliferação de células endoteliais de cordão umbilical humano (Browne *et al.*, 2006), o que sugere uma forte associação entre o controle do ciclo celular e a atividade de FASN. Grande parte dos ácidos graxos produzidos pelas células tumorais é incorporada nos fosfolípidos de membrana e a síntese destes fosfolípidos é bloqueada quando há inibição da síntese de ácidos graxos (Jackowski *et al.*, 2000; Menendez *et al.*, 2005b). A biossíntese de fosfolípidos é maior entre as fases G1 e S do ciclo celular, quando a membrana praticamente dobra em massa, antes da divisão celular. Portanto, a inibição de FASN leva a um acúmulo das células da fase G1 provavelmente por inibir a síntese de ácidos graxos destinados à síntese de membranas celulares (Menendez *et al.*, 2005b). Além de inibir a síntese de ácidos graxos, o tratamento com orlistat bloqueia o ciclo celular nas fases G0/G1, inibe a expressão de ErbB2 e aumenta os níveis da proteína supressora de tumor p27<sup>Kip1</sup>, levando as células à apoptose (Menendez *et al.*, 2004; 2005a). Recentemente demonstramos que em células B16-F10 derivadas de melanoma murino, o tratamento com orlistat resulta em acúmulo da proteína p27<sup>Kip1</sup>, uma das principais proteínas responsáveis pela repressão do ciclo celular nas fases G0/G1, ao mesmo tempo em que reduziu os níveis da proteína Skp2, responsável pela ubiquitinação e subsequente degradação da proteína p27<sup>Kip1</sup> (Carvalho *et al.*, 2008).

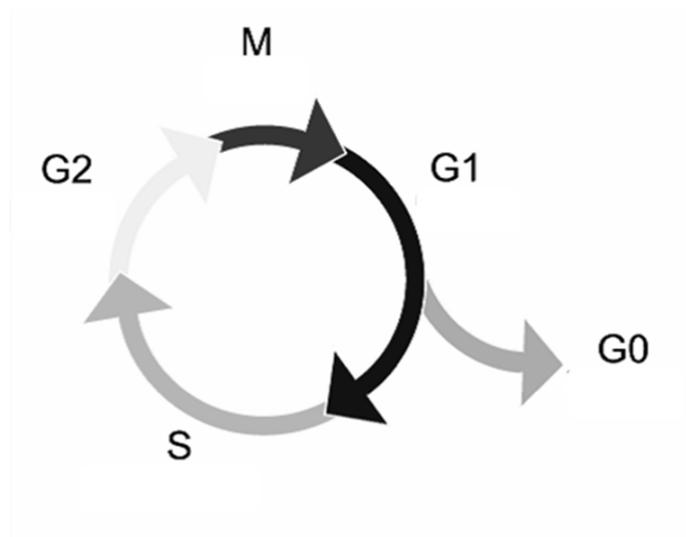
Os mecanismos pelos quais a inibição de FASN impede a progressão do ciclo celular e induz apoptose não estão totalmente esclarecidos. Algumas hipóteses foram propostas e o envolvimento mitocondrial está presente em parte destes processos. As

informações disponíveis na literatura até o momento sugerem que a inibição de FASN leva a: **(1)** acúmulo do intermediário malonil-CoA que, por sua vez, inibe a enzima carnitina palmitoiltransferase-1 da membrana mitocondrial, responsável pela transesterificação de acil-CoA de cadeia longa em acil-carnitina, que então entra na mitocôndria para ser oxidada (Bandyopadhyay *et al.*, 2006); **(2)** acúmulo de ceramida, relacionada com a indução da via extrínseca de apoptose, através dos receptores de morte (Bandyopadhyay *et al.*, 2006); **(3)** aumento da expressão de genes pró-apoptóticos como Bax e Bak (Heiligtag *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006); **(4)** clivagem de PARP (*Poly(ADP-ribose) polymerase*), enzima nuclear envolvida no reparo de DNA ativada na presença de danos no material genético (Menendez *et al.*, 2005b); **(5)** aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e perda do potencial elétrico de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (Chajes *et al.*, 2006); **(6)** liberação de citocromo c e conseqüente ativação de caspases (Heiligtag *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006); **(7)** envolvimento do gene supressor de tumor p53 (Li *et al.*, 2001); e **(8)** inibição da ativação de PI3K/Akt (van de Sande *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006). Recentemente demonstramos que a inibição de FASN em células de melanoma B16-F10 induz exclusivamente a via intrínseca da apoptose, após liberação de citocromo c e ativação de caspases-8, 9 e -3, mas sem ativação de p53 (Zecchin *et al.*, 2010).

## 2.2 Ciclo celular

Ciclo celular é uma série de eventos coordenados através dos quais a célula duplica seu conteúdo e se divide. Tradicionalmente o ciclo celular é dividido em 4 fases (**Figura 3**): G1, S, G2 e M. As fases G1, G2 e S em conjunto são chamadas de intérfase, sendo G1 e G2 fases de intervalo, que fornecem tempo para a célula crescer e averiguar

o meio interno e externo, e S, a fase de síntese onde ocorre a duplicação do DNA (Malumbres & Barbacid 2001; Li *et al.*, 2006; Hochegger *et al.*, 2008; Alberts *et al.*, 2004). A fase M corresponde à mitose, quando os cromossomos são separados e as células divididas (citocinese) (Nurse, 1997; Cooper & Hausman, 2009). Depois que a citocinese é completada, a nova célula gerada pode continuar a divisão celular ou interromper sua proliferação. Células que escolhem a última opção entram em um estado conhecido como “quiescência” ou G0, no qual parâmetros bioquímicos permanecem pobremente definidos. As células que continuam a proliferar avançam para a fase G1 de um novo ciclo (Malumbres & Barbacid, 2005).



**Figura 3: Representação das fases do ciclo celular.** A intérfase é formada pelas fases G1, S e G2, enquanto M representa a fase mitótica. Células em repouso permanecem em G0.

A duração de cada fase do ciclo varia muito entre os diferentes tipos de células. Para uma célula humana típica e em proliferação, o ciclo dura cerca de 24 h, sendo 11 h em G1, 8 h em S, 4 h em G2 e 1 h em M (Cooper & Hausman, 2009).

Para assegurar a correta progressão do ciclo celular, as células apresentam uma série de pontos de checagem, os quais previnem que a célula entre em uma fase até que tenha completado com sucesso a fase anterior. Desequilíbrios nestes controles resultam em proliferação descontrolada e possibilitam o crescimento neoplásico (Malumbres & Barbacid, 2001). Existem 4 pontos de checagem, bem caracterizados, sendo estes modulados por fatores internos e externos. Ao final da fase **G1** existe um ponto após o qual a célula está comprometida com o ciclo, chamado “ponto de restrição”, termo este proposto por Arthur Pardee em 1974. O ponto de restrição em G1 corresponde ao ponto de checagem onde são verificados tamanho e estado fisiológico da célula, bem como as interações com o meio extracelular. Caso haja alguma alteração nesses parâmetros, as células podem interromper a proliferação e/ou entrar em morte por apoptose. O ponto de checagem da fase S averigua possíveis erros na replicação do DNA. Ao final de **G2** há busca por DNA danificado ou não duplicado, além de análise da correta duplicação dos centrômeros. Na fase **M**, o ponto de checagem identifica se os cromossomos foram corretamente alinhados ao fuso mitótico (Malumbres & Barbacid, 2001; Bucher & Britten, 2008).

### **2.2.1 Controle do ciclo celular**

A progressão pelas fases do ciclo celular é resultado de uma seqüência de ativações e inibições de quinases dependentes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases* –

**cdks**), enzimas que regulam positivamente o ciclo celular, sendo que a interação dessas serinas/treoninas quinases com suas respectivas **ciclinas** permite a correta progressão do ciclo em células normais (Malumbres & Barbacid, 2005; Fecher *et al.*, 2009). O termo “quinase dependente de ciclina” foi estipulado durante o *Cold Spring Harbor Symposium on Cell Cycle* em 1991, segundo o qual uma quinase só deve ser chamada de cdk se sua atividade for dependente da associação com algumas subunidades regulatórias ciclina-*like* (Malumbres & Barbacid, 2005; Malumbres *et al.*, 2009).

O nível das ciclinas oscila durante o ciclo celular e sua disponibilidade é uma maneira de controlar a atividade das cdks e a proliferação celular (Neganova & Lako, 2008). A atividade das cdks é regulada em múltiplos níveis, incluindo síntese, degradação fosforilação e desfosforilação de ciclinas, assim como síntese, ligação, degradação e localização subcelular de proteínas inibidoras de cdks (*cdk inhibitors* – cki) (Carnero, 2002). A conexão bioquímica entre cdks e ciclinas foi feita em 1989, quando investigadores mostraram a associação de cdk1 com ciclina A e ciclina B em oócitos de moluscos, de *X. laevis* e estrelas do mar (Malumbres & Barbacid, 2005), e a importância das cdks na transição do ciclo celular foi sugerida por estudos nos quais a expressão de mutantes dominantes negativos ou a introdução de pequenas moléculas inibitórias culminaram na parada em fases específicas do ciclo celular (Chung & Bunz, 2010).

O número de cdks e ciclinas tem aumentado consideravelmente durante a evolução, porém somente alguns complexos ciclinas/cdks são necessários para o controle da progressão do ciclo celular (Malumbres & Barbacid, 2009). Por exemplo, para dar início à fase S, é necessária a formação dos complexos ciclina D/cdk4/6 e ciclina E/cdk2, enquanto que, para se progredir pela fase S, é necessária a formação do complexo ciclina A/cdk2 (Hochegger *et al.*, 2008; Fecher *et al.*, 2009).

As ckis são proteínas conhecidas como inibidores de quinases dependentes de ciclinas e controlam a ativação ou inibição de complexos quinases (Ellis *et al.*, 1999). Sendo divididas em duas famílias (van Riggelen & Felsner, 2010). A família **kip/cip** (*kinase inhibitor protein/cyclin-dependent kinase interacting protein*) é composta por p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> e p57<sup>kip2</sup>, enquanto p16<sup>Ink4a</sup>, p15<sup>Ink4b</sup>, p18<sup>Ink4c</sup> e p19<sup>Ink4d</sup> em ratos ou p14<sup>Arf</sup> em humanos compõem a família **Ink** (*inhibitor of kinase*) (Ellis *et al.*, 1999; Joyce & Harris, 2010). Todas as ckis resultam em parada do ciclo celular após serem ativadas por estímulos antimitogênicos ou quando superexpressas (Carnero, 2002). Muitos tumores apresentam alteração na atividade de ckis, indicando que estas proteínas são críticas para o controle da proliferação (Ellis *et al.*, 1999).

As cdks são ativadas quando se ligam a suas moléculas regulatórias, as **ciclinas**, as quais constituem um grupo diversos de proteínas de 35 a 90 kDa, que se acumulam durante a interfase e são destruídas na mitose. Existem mais de 16 ciclinas humanas, as quais atuam nas fases G1, G2 e M do ciclo celular, embora algumas ciclinas funcionem independentemente do ciclo. A degradação dessas proteínas a cada ciclo celular é mediada por ubiquitina e o proteossomo 26S (Malumbres & Barbacid, 2005; Li *et al.*, 2006; Abbas & Dutta, 2009; Malumbres & Barbacid, 2009).

O aumento da proliferação celular na ausência de estímulos externos é uma característica comum aos tumores malignos, do mesmo modo que distúrbios no controle normal do ciclo celular geram instabilidades genômicas que contribuem para o desenvolvimento e/ou progressão de muitas malignidades (Li *et al.*, 2006; Malumbres & Barbacid, 2009).

### 2.2.2 Regulação da transição de G1 para S em células normais e tumorais

Diversas são as proteínas que regulam o ciclo celular. Entre elas está **p21<sup>WAF1/Cip1</sup>**, proteína que contém 21 kDa, com aproximadamente 166 aminoácidos codificados pelo gene *CDKN1A*, localizado no cromossomo 6 (6p21.2). Pertence à família de ckis kip/cip e se localiza no núcleo e citoplasma das células, embora somente a forma nuclear da proteína p21<sup>WAF1/Cip1</sup> tenha função de cki (Li *et al.*, 2006; Abbas & Dutta, 2009). p21<sup>WAF1/Cip1</sup> é ativada pelo supressor de tumor p53 quando há danos no DNA e também age como supressora de tumor, inibindo as cdk e a fosforilação da proteína Rb (Ho *et al.*, 2007; Abbas & Dutta, 2009). p21<sup>WAF1/Cip1</sup> está envolvida na senescência celular, diferenciação e apoptose através de mecanismos independentes de p53. Apresenta efeitos positivos e negativos na progressão de G1 para S, com predomínio dos efeitos inibitórios. Quando presente em baixas concentrações, p21<sup>WAF1/Cip1</sup> facilita a ligação de ciclina D1 com cdk4/6, porém em altas concentrações inibe a atividade do mesmo complexo (Li *et al.*, 2006). A inibição da progressão do ciclo mediada por p21<sup>WAF1/Cip1</sup> ocorre também pela inibição da atividade de cdk2 (Abbas & Dutta, 2009). Desse modo, p21<sup>WAF1/Cip1</sup> se liga a uma larga escala de complexos ciclina/cdk, com preferência por aqueles que contêm cdk2 (Li *et al.*, 2006). Redução da expressão de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> está associada com tumores malignos humanos de diversas localizações, tais como carcinoma colorretal, cervical, de cabeça e pescoço, além de carcinoma de pequenas células de pulmão (Abbas & Dutta, 2009). Mutações no gene que codifica p21 foram detectadas em melanomas, porém não está claro seu envolvimento na gênese deste tumor. Sabe-se que os níveis de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> são baixos ou indetectáveis na maioria dos nevus, porém há aumento de sua expressão em melanomas primários e metastáticos (Li *et al.*, 2006; Abbas & Dutta, 2009).

**p27<sup>kip1</sup>** (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) é uma proteína nuclear e citoplasmática de 22 kDa, com aproximadamente 198 aminoácidos codificados pelo gene *CDKN1B*, localizado no cromossomo 12p12-12p13 (Malumbres & Barbacid, 2009). É um membro kip da família de ckis, considerada um supressor de tumor, embora somente sua forma nuclear tenha essa função (Polyak *et al.*, 1994; Soos *et al.*, 1996; Matsuda & Ichida, 2006). Apresenta 44% de homologia estrutural com p21<sup>WAF1/Cip1</sup> na porção N-terminal, agindo de maneira semelhante, por se ligar ao complexo ciclina D/cdk4 e por regular negativamente ciclina E/cdk2 e ciclina A/cdk2 (Li *et al.*, 2006; Hershko, 2008). Os níveis da proteína p27<sup>kip1</sup> oscilam durante o ciclo celular, sendo mais elevados em G0/G1 e menores em S (Hershko, 2008). A degradação de p27<sup>kip1</sup> ocorre no final da fase G1, através de um processo dependente de Skp2 (*S phase kinase-associated protein 2*), uma ligase da ubiquitina E3, responsável pela ubiquitinação de p27<sup>kip1</sup> e que, portanto, permite a passagem de G1 para S (Schrumpp *et al.*, 1996; Loda *et al.*, 1997; Hershko, 2008; Mitra & Fisher, 2009). O gene que codifica p27 é raramente alterado em tumores malignos, mas o baixo nível de p27<sup>kip1</sup> foi associado a um pior prognóstico em tumores de mama, próstata, sarcomas e tumores hematológicos (Ellis *et al.*, 1999; Hershko, 2008). Mutações neste gene são raras em melanomas, porém a transição de nevo para melanoma primário e metastático mostra perda progressiva da expressão de p27<sup>kip1</sup> (Li *et al.*, 2006).

**Skp2** (*S phase kinase-associated protein 2*) possui 45 kDa e é um dos componentes do complexo SCFskp2 ubiquitina ligase (SCF, *Skp1-Cullin1-F-box protein*), que também conta com a proteína acessória cks1 (*cyclin kinase subunit 1*) (Bornstein *et al.*, 2003). Contém um motivo de ligação de aproximadamente 40 resíduos, denominado F Box, associado com regiões ricas em leucina (*leucine rich regions – LRRs*) (Chiariello & Esposito, 2006). Trata-se de uma proteína essencial para a passagem de G1 para S, uma

vez que é responsável pela poliubiquitinação dos reguladores do ciclo celular, p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> e p57<sup>Kip2</sup> (Schrump *et al.*, 1996; Loda *et al.*, 1997; Vodermaier, 2004; Hershko, 2008; Mitra & Fisher, 2009). Skp2 reconhece especificamente p27<sup>Kip1</sup> fosforilada, predominantemente na fase S do que em G1, diminuindo os níveis desse inibidor de cdk e culminando na passagem para a fase S (Chiariello & Esposito, 2006). Os níveis de Skp2 oscilam durante o ciclo celular, atingindo níveis máximos na fase S (Bornstein *et al.*, 2003), sendo que a diminuição de sua expressão, ao menos em células quiescentes, parece depender de um processo de autoubiquitinação (Vodermaier, 2004). Aumento da expressão de Skp2 foi verificado durante os diferentes estágios da progressão do melanoma (Li *et al.*, 2006).

Dentre as mais de 16 ciclinas humanas, duas possuem papel de destaque na transição da fase G1 para S do ciclo celular: ciclinas E e D1. A **ciclina E** humana foi identificada em 1991, em bibliotecas de cDNA (Koff *et al.*, 1991). O gene humano da **ciclina E** *CCNE* foi mapeado no cromossomo 19 (19q12-q13) (Mumberg *et al.*, 1997) e codifica polipeptídeos com peso molecular variando entre 39 a 52 kDa. A mais conhecida ciclina E, de 45 kDa, contém um domínio que se estende do aminoácido da posição 129 a 215, chamado *cyclin Box*, cuja seqüência é conservada entre as ciclinas (Moroy & Geisen, 2003). Mais recentemente, seis outros *splicings* foram descobertos, os quais resultam em isoformas de ciclina E com peso molecular substancialmente alterado (Moroy & Geisen, 2003). Ciclina E reside no núcleo e esta localização depende de proteínas de importação *importin- $\alpha$*  e *importin- $\beta$*  (Moroy & Geisen, 2003). Os níveis de ciclina E variam durante o ciclo celular, atingindo níveis máximos na fase G1 (Koff *et al.*, 1992), podendo ter sua expressão aumentada ou reduzida por proteínas da família do fator de transcrição E2F. A ativação da transcrição do gene da ciclina E no final de G1 depende da atividade de

ciclina D, as quais são sintetizadas primeiramente (Moroy & Geisen, 2003; Barton *et al.*, 2006). A ciclina D forma um complexo com cdk4 ou cdk6 e fosforila em particular a proteína Rb (*ver adiante*). Esta fosforilação leva à liberação de E2F e à ativação da transcrição do gene da ciclina E. Os complexos formados por ciclina E/ckd2 também fosforilam Rb, p130 e p107 (*ver adiante*), assim a concentração de E2F aumenta e conduz a amplificação da transcrição da ciclina E. O complexo ciclina E/ckd2 fosforila E2F e, dessa maneira, modula sua atividade, constituindo este um mecanismo clássico de *feedback* para a ciclina E controlar a própria transcrição (Abbas & Dutta, 2009). Ciclina E, assim como outras ciclina de G1, é ubiquitinada pelas multiproteínas do complexo SCF (Moroy & Geisen, 2003). Em células normais, ciclina E só é expressa quando necessária, sendo rapidamente degradada. Por outro lado, células de tumores de mama apresentam aumento da expressão de ciclina E, a qual mantém níveis constantes ao longo das demais fases do ciclo celular (Keyomarsi *et al.*, 1995; Sgambato *et al.*, 1997; Barton *et al.*, 2006). O papel crucial de ciclina E na transição G1-S foi descrito em meados de 1990 por 2 estudos. A microinjeção de anticorpos contra ciclina E em fibroblastos em G1 resultou em inibição da proliferação (Ohtsubo *et al.*, 1995), enquanto a superexpressão contínua de ciclina E encurtou a fase G1, diminuindo tanto o tamanho das células como a necessidade de fatores de crescimento, para que ocorresse a proliferação de fibroblastos (Ohtsubo & Roberts, 1993). Ciclina E se liga e ativa cdk2, iniciando a transição G1-S (Ohtsubo *et al.*, 1995), sendo que a atividade quinase do complexo ciclina E/ckd2 também está associada com a fidelidade cromossomal, incluindo duplicação de centrossomos (Fisk & Winey, 2001) e duplicação de genes envolvidos na transcrição, como as histonas (Zhao *et al.*, 1998; 2000; Ma *et al.*, 2000).

Outra ciclina importante na transição G1-S é a **ciclina D1**, uma proteína nuclear, sintetizada no começo da fase G1. Existem três isoformas de ciclina D (D1, D2 e D3), as quais são expressas diferentemente em vários tecidos (Masamha, 2009). O membro melhor caracterizado da família das ciclinas D é a ciclina D1, a primeira ciclina da fase G1 identificada em mamíferos (Sutherland & Musgrove, 2009). Possui 34 kDa e 295 aminoácidos codificados pelo gene *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13. Ciclina D1 é sintetizada no início de G1 e age antecipadamente nesta fase com suas cdk's associadas em resposta a estímulos mitogênicos, como por exemplo, a ativação do fator de crescimento Ras (Grossel *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006; Macleod, 2008). Forma complexos com cdk4/6, o que resulta na fosforilação e inativação de Rb e liberação de E2F, levando à progressão do ciclo celular. Tais eventos facilitam a ativação de ciclina E/cdk2 e ciclina A/cdk2, complexos necessários para a entrada e progressão na fase S (Li *et al.*, 2006). Desse modo, quando não há proliferação, não há formação dos complexos com cdk's e, portanto, os níveis das ciclinas caem rapidamente. Ciclina D1 é raramente mutada, mas sua superexpressão confere uma vantagem de crescimento seletivo e, conseqüentemente, age como um indutor de crescimento em várias neoplasias malignas (Masamha *et al.*, 2009). Alguns trabalhos mostram rearranjos, amplificação e aumento da expressão do gene de ciclina D1, assim como superexpressão de seu RNAm em muitos tipos de tumores humanos, incluindo adenomas da paratireóide, linfomas de células B, mama, colo de útero, pulmão, vesícula e fígado, e carcinoma escamoso do esôfago, cabeça e pescoço (Tashiro *et al.*, 2007). Níveis altos e constantes de ciclina D1 foram demonstrados em linhagens celulares de melanomas, bem como em metástases desse tumor (Li *et al.*, 2006; Masamha *et al.*, 2009).

Conforme citado anteriormente, as cdk2 são enzimas que regulam positivamente o ciclo celular, levando à proliferação celular (Fecher *et al.*, 2009). Diferentemente das ciclinas, seus níveis são relativamente constantes em todas as fases da proliferação celular (Hochegger *et al.*, 2008). Em G1 há duas classes de cdk2 específicas que necessitam ser ativadas para a entrada na fase S. Essas classes são representadas pelas cdk4/cdk6 e cdk2 que são reguladas por ciclinas D e E respectivamente, conforme descrito a seguir (Neganova & Lako, 2008). De modo geral, as cdk2 consistem em subunidades catalíticas, usualmente com 34 kDa (Nurse, 1997).

**Cdk2** é uma quinase dependente de ciclinas, produto do gene  $p33^{cdk2}$ , presente no cromossomo 10 e que possui 34 kDa (Meyerson *et al.*, 1992; de Bondt *et al.*, 1993). Participa da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular, onde cdk2 interage com as ciclinas E ou A, sendo seqüencialmente ativada por estas ciclinas, formando complexos para a fosforilação seqüencial da proteína Rb (Carero, 2002; Berthet *et al.*, 2003; Hochegger *et al.*, 2008; van Riggelen & Felsner, 2010). Ciclina E/cdk2 também age como iniciador chave da duplicação dos centrossomos (Berthet *et al.*, 2003; Fukasawak, 2008). Cdk2 é a principal cdk que se liga à ciclina E (Hochegger *et al.*, 2008), sendo que os níveis mais altos dessa ciclina estão diretamente relacionados à função máxima do complexo ciclina E/cdk2. (Koff *et al.*, 1992). A regulação da atividade de ciclina E/Cdk2 ocorre em muitos níveis, incluindo inibidores mediados por ckis como  $p21^{WAF1/Cip1}$  e  $p27^{kip1}$  (van Riggelen & Felsner, 2010). A importância de cdk2 na regulação do ciclo celular foi demonstrada pela expressão de mutante dominante negativo para cdk2, o qual resultou em bloqueio de células de osteossarcoma humano na fase G1 (Berthet *et al.*, 2003). Por outro lado, foi sugerido que cdk2 não é necessária para a progressão do ciclo celular em células imortalizadas, uma vez que linhagens celulares de câncer de colón

proliferam normalmente após depleção de cdk2 (Berthet *et al.*, 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que camundongos deficientes de cdk2 se desenvolveram normalmente, indicando que essa quinase não é necessária para o desenvolvimento embrionário (Berthet *et al.*, 2003). Desse modo, parece haver um mecanismo compensatório com as demais cdks, justificado pelo fato de cdk1 e cdk2, por exemplo, possuírem mais de 60% de homologia em suas seqüências de aminoácidos (Hochegger *et al.*, 2008). Até o presente momento não foram detectadas mutações em cdk2 em neoplasias malignas humanas (Malumbres & Barbacid, 2009).

Outras duas cdks importantes para a passagem para a fase S são **cdk4** e **cdk6**, cdk4 é codificada pelo gene *cdk4* mapeado no cromossomo 12q14, enquanto cdk6 é codificada pelo gene *cdk6* mapeado no cromossomo 7q21-q22 (Demetrick, 1994). São proteínas muito próximas, com homologia em 71% de seus aminoácidos e que apresentam propriedades bioquímicas também semelhantes. Ambas ligam-se à família das ciclinas D (D1, D2 e D3) durante G1, inativando Rb (Grossel *et al.*, 1999; Malumbres *et al.*, 2004; Grossel & Hinds, 2006; Malumbres & Barbacid, 2009). Apesar das semelhanças, estudos recentes *in vitro* mostraram que cdk4 e cdk6 fosforilam Rb em resíduos distintos: cdk4 preferencialmente fosforila Rb no resíduo treonina no aminoácido 826, enquanto cdk6 preferencialmente fosforila na treonina 821 (Grossel & Hinds, 2006). Diferenças entre cdk4 e cdk6 têm sido identificadas em diversos modelos experimentais. Em células T, por exemplo, a ativação de cdk6 precede em algumas horas a ativação de cdk4 (Grossel & Hinds, 2006). Aumento da atividade de cdk4 e/ou cdk6 leva à proliferação descontrolada e tumorigênese que, subseqüentemente, desencadeia a inativação de Rb em muitos tipos de tecidos (Grossel *et al.*, 1999), sendo que este aumento da atividade das cdks pode ser resultado da superexpressão de subunidades reguladoras, como

ciclina D, ou ser resultado da amplificação de genes que codificam tais quinases (Grossel *et al.*, 1999). Aumento da atividade de cdk4 e cdk6 ocorre em diversos tumores malignos humanos, com preferência de cdk4 para tumores epiteliais (tecidos endócrinos e mucosas), incluindo melanoma, e de cdk6 para tumores mesenquimais, incluindo leucemias, sarcomas (Malumbres & Barbacid, 2009). Elevada atividade de cdk6 também foi relatada em carcinoma de células escamosas e neuroblastomas, sem que houvesse alterações da atividade de cdk4 (Grossel & Hinds, 2006).

Localizado no cromossomo 13q14, o gene *Rb* codifica uma proteína nuclear de 928 aminoácidos e com peso molecular de 110-115 kDa (Li *et al.*, 2006; Macleod, 2008). Existem três membros da família retinoblastoma de proteínas nucleares, que incluem Rb, pRb2/p130 e p107. Durante a fase G1, a fosforilação da proteína **Rb** pelos complexos ciclinas/cdks (ciclina D1/cdk4 ciclina, E/cdk2 ou ciclina A/cdk2) leva à liberação do fator de transcrição E2F, o qual ativa a transcrição de diversas proteínas, por exemplo, DNA polimerase, ciclinas A e E, e a própria Rb, necessárias para a progressão da fase S. Rb permanece hiperfosforilado por ciclina E/cdk2 no restante do ciclo (Li *et al.*, 2006). Rb é expresso constantemente por células que estejam ou não em proliferação (Burkhart & Sage, 2008). Mutações em Rb são raras em melanomas, mas alguns estudos mostram maior quantidade de pRb, assim como maior quantidade de E2F livre em células de melanoma do que em melanócitos normais (Li *et al.*, 2006). Aumento significativo da expressão de Rb também foi observado, *in vivo*, em melanomas avançados e metastáticos (Li *et al.*, 2006).

A proteína nuclear supressora de tumor **p16<sup>Ink4a</sup>** é codificada por 156 aminoácidos, pelo gene *CDKN2A*, localizado no cromossomo 9p21. Pertence à família Ink (*inhibitor of kinase*) e também controla a transição G1-S (Li *et al.*, 2006). Expressão

aumentada ocorre na senescência celular e também no envelhecimento de vários tecidos (Shima *et al.*, 2010). Por se ligar especificamente a cdk4 e cdk6, p16<sup>Ink4a</sup> inibe a formação dos complexos ciclina D1/cdk4/6, necessários para a fosforilação de Rb. Desse modo, Rb permanece ligado a E2F bloqueando a proliferação celular (Li *et al.*, 2006; Fecher *et al.*, 2009; Mitra & Fisher, 2009). A perda da expressão de p16<sup>Ink4a</sup> têm sido demonstradas em quase 50% dos melanomas primários, com níveis muito similares em muitos outros tumores malignos (Li *et al.*, 2006).

### 2.3 Melanoma

Melanoma é um tumor maligno que se origina de melanócitos, células derivadas da crista neural e que se localizam próximas à lâmina basal. A principal função dos melanócitos é a produção de melanina, pigmento que confere cor à pele, cabelos e olhos, protegendo contra a radiação UV (Ibrahim & Haluska, 2009; Malumbres & Barbacid, 2009). O melanoma é a neoplasia maligna de pele e mucosas de pior prognóstico e com altas taxas de mortalidade, decorrentes de seu alto índice de metástases e a sua baixa sensibilidade a radioterapia e quimioterapia (Li *et al.*, 2006). É prevalente em regiões de grande exposição solar como Austrália, sul da Europa, África do Sul e sul dos Estados Unidos (Ibrahim & Haluska, 2009). No Brasil corresponde a 4% de todos os tumores de pele e a estimativa de novos casos para 2010 é de 5.930, sendo 2.960 homens e 2.970 mulheres (INCA, 2010). O melanoma é um grande problema de saúde pública não somente por sua incidência e propensão em afetar adultos jovens, mas também pelo alto potencial metastático, conduta clínica agressiva e notável resistência aos tratamentos quimioterápicos e imunológicos (Malumbres & Barbacid, 2009).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma incluem múltiplos nevos benignos ou atípicos, história familiar e história pessoal de melanoma (Ibrahim & Haluska, 2009; Malumbres & Barbacid, 2009). Outro fator conhecido é a exposição excessiva à radiação UV, responsável por mutações no DNA, indução de fatores de crescimento, redução das defesas imunes e estímulo para a produção de espécies reativas de oxigênio que, somados, culminam em danos irreversíveis ao material genético (Malumbres & Barbacid, 2009).

A maior parte (90%) dos casos de melanoma é esporádica, mas o conhecimento da base genética dos casos familiares de melanoma tem ajudado na compreensão da patogênese molecular desta doença (Ibrahim & Haluska, 2009). A base molecular do melanoma começou a ser esclarecida em meados de 1990, quando foram observadas mutações no gene regulador do ciclo celular *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), localizado no cromossomo 9p21 (Lin *et al.*, 2008). *CDKN2A* codifica duas proteínas inibidoras de quinase, p16<sup>Ink4a</sup> e p14<sup>ARF</sup> (Ibrahim & Haluska, 2009). Conforme descrito anteriormente, p16<sup>Ink4a</sup> inibe cdk4/6, responsáveis pela fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) que, no seu estado hipofosforilado ativo, liga-se a E2F e inibe a progressão do ciclo celular (Lin *et al.*, 2008). Já p14<sup>ARF</sup> promove a estabilização da proteína supressora de tumor p53, prevenindo sua degradação mediada por Mdm2 (Lin *et al.*, 2008).

O gene que codifica p16 está mutado ou deletado na maioria das culturas de linhagens de células de melanoma e em casos de melanoma familiar. Em melanomas esporádicos as mutações nesse gene são raras. Um número de possíveis mecanismos incluindo deleções, perda de heterozigidade, mutações gênicas e hipermetilação de regiões promotoras foram encontradas como resultado da inativação do gene que codifica

p16 e perda da expressão da proteína p16<sup>Ink4a</sup> em melanomas (*para revisão ver Li et al., 2006*).

Mutações em cdk4 também têm sido relacionadas ao desenvolvimento do melanoma, conferindo resistência à atividade inibidora de p16<sup>Ink4a</sup> (*Lin et al., 2008*). Além disso, sabe-se que a transformação de melanócitos em células de melanoma decorre de alterações nos mecanismos de controle do ciclo celular, mais especificamente em p53 e Rb (*Li et al., 2006*). Nesse caso, as alterações mais comuns nos mecanismos que envolvem a ação de Rb são (i) superexpressão de ciclina D1, (ii) superexpressão e mutações em cdk4 ou (iii) mutações ou deleções de p16<sup>Ink4a</sup> (*Li et al., 2006; Fecher et al., 2009*).

Considerando-se que:

- ✓ em várias neoplasias malignas, dentre as quais o melanoma, a alta expressão de FASN está associada a um pior prognóstico,
- ✓ existem evidências de que, nas células malignas, a atividade de FASN é necessária para a produção de fosfolípidios que compõem as membranas celulares,
- ✓ a inibição de FASN está associada à diminuição da capacidade de proliferação e indução de apoptose em células tumorais,
- ✓ os mecanismos biológicos que governam as interações entre atividade metabólica lipogênica e as moléculas que controlam o ciclo celular ainda não são conhecidos,

decidimos avaliar de que maneira a intensidade da síntese endógena de lipídios interfere no ciclo celular de células de melanoma murino B16-F10.

### ***3 OBJETIVOS***

---

---

#### **3. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar de que maneira a inibição farmacológica de FASN reduz a proliferação de células de melanoma B16-F10, *in vitro*.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de cerulenina sobre as taxas de proliferação e morte de células B16-F10.
- ✓ Analisar os efeitos inibição de FASN com cerulenina sobre o conteúdo de diversas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, tais como p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, Skp2, ciclinas e cdks.
- ✓ Verificar a relação entre inibição da proliferação celular e indução de apoptose, após a inibição de FASN com cerulenina, nas células de melanoma B16-F10.

## ***4 MATERIAIS E MÉTODOS***

---

---

### **4.1 Cultura de Células**

Células B16-F10, derivadas de melanoma de camundongo, foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA) e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm<sup>2</sup> (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen), na diluição de 1:100, a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

As células foram cultivadas até atingirem 80% de confluência. Para a manipulação das células, o meio de cultura era removido e as células lavadas com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. Em seguida, as células eram incubadas com 2 mL de tripsina a 2% até seu desprendimento total da superfície. A ação da tripsina era interrompida pela adição de 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. A suspensão de células era transferida para tubos cônicos de plástico estéreis de 15 mL (Corning, EUA) e centrifugadas a 4.000 rpm por 3 min. O sobrenadante era removido e descartado e o *pellet* de células ressuspensado em 10 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Cerca de 20 µL do homogenato de células eram usados para contagem em hemocítômetro e posterior montagem dos experimentos. Visando trabalhar com células em passagens semelhantes várias amostras foram congeladas antes da realização dos experimentos. Para isto, as células foram

ressuspensas em solução contendo 20% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, EUA) e 80% de SFB e congeladas em nitrogênio líquido.

#### **4.2 Preparo da Cerulenina**

Cerulenina (Sigma, EUA) foi dissolvida em DMSO para uma concentração final estoque de 20 mg/mL e armazenada a -20°C. As células do grupo controle receberam o mesmo volume de DMSO que as células tratadas com as diferentes concentrações de cerulenina não ultrapassando o volume máximo de 0,05%.

#### **4.3 Citometria de fluxo**

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi, no departamento de Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Cerca de  $10^6$  células B16-F10/mL foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson, EUA). As populações celulares foram identificadas por suas características de tamanho e granulosidade e analisadas separadamente por intensidade de fluorescência das sondas específicas.

#### 4.4 Curva de Proliferação

Para avaliarmos os efeitos citotóxicos e antiproliferativos da cerulenina, cerca de 45.000 células foram plaqueadas em 2 mL de meio suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, contendo concentrações crescentes de cerulenina (1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µg/mL). Após 24 h de tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de meio de cultura não suplementado. O número total de células foi determinado em citômetro de fluxo após 1 min de leitura em velocidade de 60 µL/min (Naliwaiko *et al.*, 2008).

#### 4.5 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A porcentagem de células viáveis após tratamento com cerulenina foi determinada usando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma), uma vez que células viáveis são capazes de reduzir o sal *tetrazolium* MTT, de cor amarela, em *formazan*, de cor púrpura (Mosmann, 1983). Cerca de 45.000 células foram plaqueadas em 2 mL de meio suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, contendo concentrações crescentes de cerulenina. Completadas 24 h de tratamento, o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura não suplementado, preparado com 0,3 mg/mL de MTT sendo as células incubadas por 3 h a 37°C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Em seguida o meio de cultura foi desprezado e, em cada poço, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto (Merck, Alemanha), para a solubilização do *formazan* produzido. O conteúdo de cada poço foi homogeneizado e transferido para

placas de 96 poços, obtendo-se a leitura da absorbância a 540 nm em leitor automático de ELISA (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação aos controles.

#### **4.6 Avaliação das taxas de apoptose**

A porcentagem de células em apoptose foi determinada pela marcação com Anexina V-FITC (Caltag, Inglaterra). Cerca de 45.000 células foram plaqueadas em 2 mL de meio suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, contendo diferentes concentrações de cerulenina. Após 24 h de tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e incubadas com 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de Anexina V-FITC em tampão de ligação contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 1,8 mM de  $\text{CaCl}_2$ , no escuro, à temperatura ambiente. Após 20 min, a porcentagem de células Anexina V positivas foi determinada em citometria de fluxo, em canal FL1.

#### **4.7 Análise do ciclo celular**

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada após marcação com iodeto de propídeo. Cerca de 45.000 células foram plaqueadas em 2 mL de meio suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco não suplementado, ou seja, na ausência de SFB, a fim de se promover a sincronização das células. Após mais 24 h, o meio de cultura foi novamente trocado e as células foram tratadas com cerulenina na presença de 10% de

SFB. Completadas 24 h de tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e fixadas em etanol 70% gelado por, pelo menos 12 h, a -20°C. Para a marcação das fases do ciclo celular, as células foram lavadas com PBS gelado e tratadas com 10 µg/mL de RNase (Sigma) a 37°C durante 1 h. Em seguida, as células foram coradas com 50 µg/mL de iodeto de propídeo a 4°C, no escuro, por 2 h e analisadas em citometria de fluxo, em canal FL2. Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, utilizou-se o programa ModFit LT™ (Verity Software House, EUA).

#### 4.8 Lipogênese

Os ensaios de lipogênese foram realizados no laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena C.F. Oliveira, com a ajuda de sua aluna de doutorado Helena F. Raposo, no Laboratório de Lípidos, do Instituto de Biologia da UNICAMP.

As células B16-F10 foram plaqueadas ( $10^5$ /mL) em garrafas de 150 cm<sup>2</sup> e, após 24 h, tratadas com diferentes concentrações de cerulenina por 6 h. Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas ( $10^6$ /mL) em 1 mL de meio contendo 10% de SFB, conforme o tratamento inicial. As células foram colocadas em atmosfera de carbogênio (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) e incubadas com 1 mCi de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O por 1 h a 37°C, sob agitação constante. Após a incubação, as reações foram interrompidas pela adição de etanol (Zambell *et al.*, 2003) e a extração de lipídios foi realizada com metanol e clorofórmio 2:1 (v/v), sob agitação constante, durante 30 min a temperatura ambiente (Bligh & Dyer, 1959; Levin *et al.*, 1992). As amostras foram centrifugadas a 10.000 xg por 15 minutos e o sobrenadante coletado. Os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de PBS e submetidos à re-extração com metanol-clorofórmio 2:1 (v/v). Os sobrenadantes contendo

os lipídios das duas extrações foram diluídos em 5 mL de clorofórmio e água, acidificado com 1 N de HCl para pH de 3,0-4,0 e centrifugados. A camada de clorofórmio foi removida e reservada. A fase aquosa foi novamente tratada com 5 mL de clorofórmio e os extratos de clorofórmio combinados foram completamente evaporados. A lipogênese foi determinada em 1 mL da solução cintiladora (incorporação de  $^3\text{H}_2\text{O}$  normalizada pelo número de células).

## 4.9 Western blotting

### 4.9.1 Obtenção dos extratos protéicos

Para cada grupo de extratos protéicos, as células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, cada uma com 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Em cada garrafa foram plaqueadas 80.000 células, mantidas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Após 24 h do plaqueamento, o meio de cada garrafa foi substituído por meio não suplementado, da mesma maneira descrita para as análises de ciclo celular (**item 4.7**). Completadas 24 h da sincronização, o meio de cultura sem SFB foi substituído por meio contendo 10% de SFB e diferentes concentrações de cerulenina. Para cada concentração estudada, foram preparadas 2 garrafas tratadas com cerulenina e 2 garrafas tratadas com o mesmo volume de DMSO. Após 24 h de tratamento, o meio de cultura com a droga foi removido e cada garrafa foi lavada com 10 mL de PBS gelado. Em seguida, foram adicionados 5 mL de PBS gelado em cada garrafa e as células raspadas utilizando-se *cell scrapers* (Costar, EUA). Os conteúdos das garrafas correspondentes foram transferidos para tubos cônicos

estéreis de plástico, gelados, centrifugados a 4.000 rpm por 3 min, lavados 1 x com 1 mL de PBS gelado e os *pellets* foram armazenados a seco a -80°C.

#### **4.9.2 Preparo dos extratos protéicos**

Os *pellets* de células foram homogeneizados em 100 µL de tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton X-100, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA, 1 mM de NaF, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, PMSF (1 mM), leupeptina (1 µg/mL), STI (*soybean trypsin inhibitor*) (10 µg/mL) e aprotinina (1 µg/mL), no gelo por 30 min, sendo homogeneizados a cada 10 min. Após este período, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4°C e os sobrenadantes coletados, sendo alíquotas de 5 µL de cada extrato protéico separadas para a dosagem da concentração de proteínas. Todos os extratos protéicos foram imediatamente congelados em gelo seco e estocados a -80°C, onde foram mantidos até o momento do uso.

#### **4.9.3 Dosagem protéica**

O método de Bradford ([Bradford,1976](#)) foi utilizado para quantificação das proteínas dos extratos totais protéicos. Foram utilizados 750 µL do reagente de Bradford (Sigma) em 749 µL água deionizada, descontando-se 1 µL para a amostra protéica. Solução de branco (750 µL de solução de Bradford, 750 µL de água deionizada e 1 µL do tampão de lise), em luz visível de comprimento de onda de 595 nm foi usada para calibrar o espectrofotômetro (Spectronic – Genesis™ 2, EUA). Os valores da absorbância das amostras foram aplicados ao gráfico da curva de Bradford, feito em planilha eletrônica

(Excel® 2007, Microsoft, EUA) a partir das leituras da solução padrão de albumina sérica bovina (BSA – Sigma) nas concentrações de 1,0 a 10 mg/mL, realizadas no mesmo procedimento. Valores de absorvância próximos às extremidades das curvas do gráfico não foram utilizados, dando-se preferência a sua região central, caracterizada por uma linha reta.

#### **4.9.4 Separação eletroforética de proteínas e western blotting**

Cerca de 40 µg de proteína total foram homogeneizados em tampão de amostra redutor quatro vezes concentrado, contendo 8% de SDS, 0,25 M de Tris-HCl (pH 6,8), 30% de glicerol, 0,2% de azul de bromofenol e 20% do volume total de *1,4-Dithiothreitol* (DTT, Sigma). As proteínas foram desnaturadas a 100°C por 5 min e então separadas eletroforeticamente em SDS-PAGE a 6 ou 12%, em tampão contendo 2,5 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 19 mM de glicina e 0,3 mM de SDS. A seguir as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher e Schuell, EUA) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 9,6 mM de glicina e 20% de metanol. A eficácia das transferências foi verificada através da coloração das membranas com o corante Ponceau S (Sigma), seguida por bloqueio em solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20 (TBST) por 18 h a 4°C. As membranas foram cortadas de acordo com o peso molecular da proteína a ser estudada e incubadas com anticorpos primários descritos na **Tabela 1**, diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado, por 2 h a 24°C, sob agitação constante. Depois de lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, as reações foram reveladas através

de quimioluminescência utilizando-se o kit de detecção ECL (Western Blotting Analysis System, Amersham Pharmacia Biotech, EUA) e expostas a filmes ultra-sensíveis (Hyperfilm Ultra Detection, Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Após secagem, as películas radiográficas foram digitalizadas em escâner GS 700 (Bio Rad, E.U.A) para a realização da densitometria óptica das bandas utilizando-se o programa Molecular Analyst (Bio Rad). Para cada proteína estudada, foram consideradas as áreas de pico correspondentes como valor da densidade óptica. Área homogênea na mesma altura das bandas foi utilizada como background para minimizar variações. Todas as bandas tiveram seus valores normalizados pelo valor da leitura da banda da beta-actina respectiva do grupo.

**Tabela 1:** Relação dos anticorpos utilizados, incluindo clones, peso molecular (kDa) e diluições.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone e Marca</b>	<b>Peso Molecular (kDa)</b>	<b>Diluição</b>
<b>FASN</b>	23 (BD Pharmigen)	250-270	1:3,000
<b>p21<sup>WAF1/Cip1</sup></b>	C-19 (Santa Cruz)	21	1:200
<b>p27<sup>Kip1</sup></b>	57 (BD Pharmigen)	27	1:500
<b>Skp2 p45</b>	H-435 (Santa Cruz)	45	1:1,000
<b>Ciclina E</b>	M-20 (Santa Cruz)	53	1:1,000
<b>Ciclina D1</b>	DCS-6 (Calbiochem)	34	1:200
<b>Cdk2</b>	M2 (Santa Cruz)	34	1:30,000
<b>Cdk4</b>	C-22 (Santa Cruz)	34	1:50,000
<b>Cdk6</b>	C-21 (Santa Cruz)	~36	1:1,000
<b>Rb</b>	C-50 (Santa Cruz)	110	1:200
<b>p16<sup>Ink4a</sup></b>	G-6 (Santa Cruz)	16	1:100
<b>Beta-actina</b>	AC-15 (Sigma)	45	1:60,000

#### 4.10 Co-imunoprecipitações

Para analisar a associação entre p27<sup>Kip1</sup> e o complexo ciclina E/cdk2, realizamos experimentos de co-imunoprecipitação de acordo com [Waltregny et al. \(2001\)](#), com algumas modificações. Cerca de 1 mg de cada extrato total protéico foi normalizado para volume de 1 mL em tampão de lise e incubados com 50 µL da suspensão de proteína A sepharose (Sigma) por 45 min a 4°C em rotor, para eliminar ligações inespecíficas. Os

complexos protéicos foram então imunoprecipitados pela adição de 3  $\mu\text{g}$  de anti-cdk2 (0,2 mg/mL, M2, Santa Cruz) a 4°C overnight, sob agitação constante. As amostras foram novamente incubadas com proteína A sepharose como descrito anteriormente. Após três lavagens com tampão de lise gelado, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra redutor sobre os beads de proteína A sepharose, sendo então as amostras fervidas e 20  $\mu\text{l}$  dos sobrenadantes aplicados em gel de poliacrilamida a 12%. Após eletroforese e transferência, as membranas foram cortadas e incubadas com anticorpos anti-p27<sup>Kip1</sup> (1:500), da mesma maneira descrita anteriormente. Após a revelação, a membrana de p27<sup>Kip1</sup> passou por *stripping* com 2% de SDS, 80 mM Tris (pH 6,7) e 2% de beta-mercaptoetanol a 60°C por 1 h, com agitações periódicas a cada 15 min. Após lavagens com TBST, as membranas foram novamente bloqueadas e prosseguiu-se com western para cdk2 (1:10,000), conforme descrito previamente, para a verificação da quantidade de cdk2 imunoprecipitada nas diferentes amostras. Imunoprecipitações com 3  $\mu\text{g}$  de IgG normal de coelho (Santa Cruz) foram utilizadas como controles negativos dos experimentos. Vinte microgramas de extrato total de uma das amostras foram também utilizados como controle de western blotting.

#### **4.11 Análise estatística**

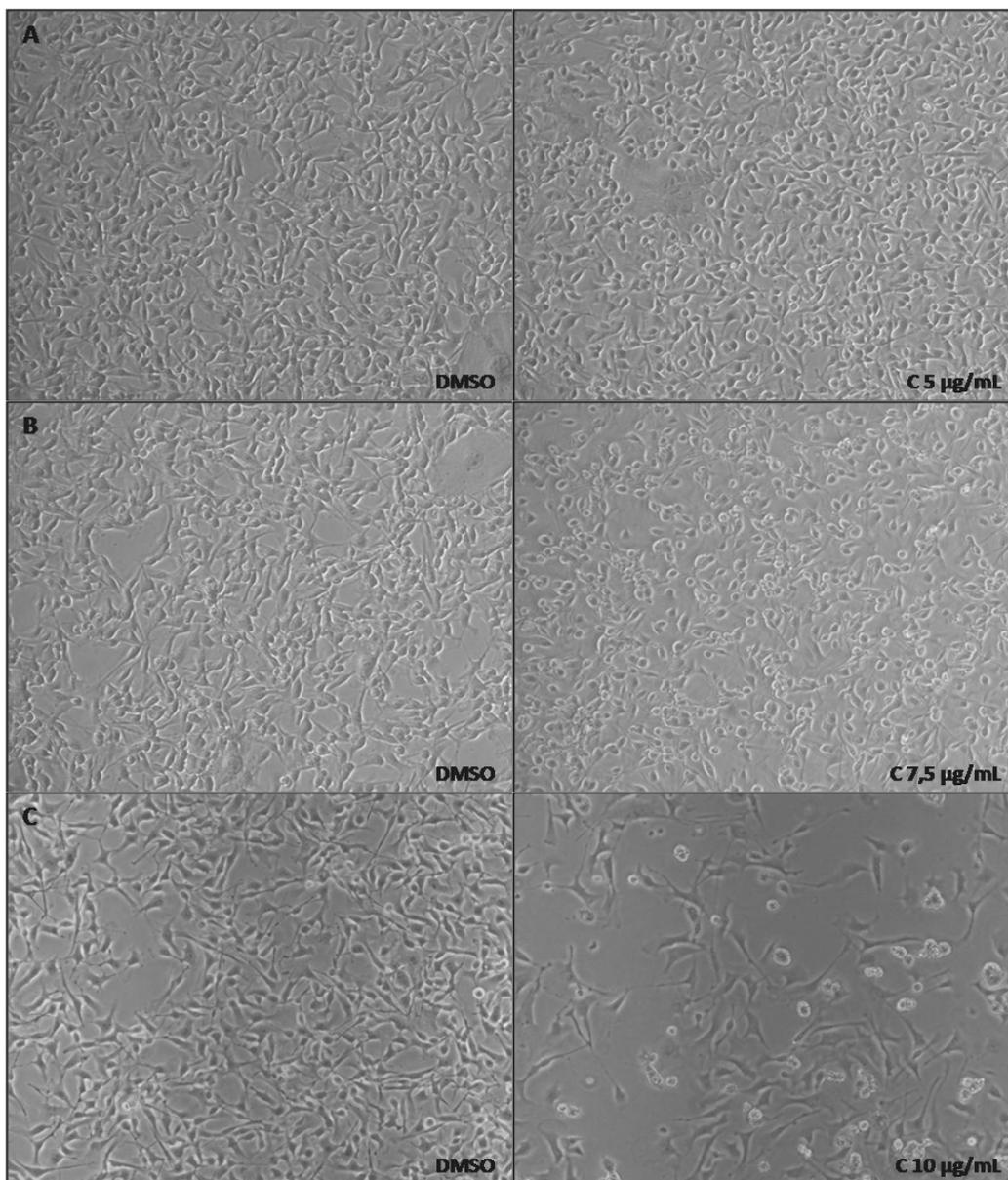
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) de, pelo menos, três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. A significância estatística dos resultados foi verificada através da análise de variância não paramétrica do teste *t* de Student e teste de Mann-Whitney, com o auxílio do programa computacional SigmaStat (Jandel Scientific Software, EUA). O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## ***5 RESULTADOS***

---

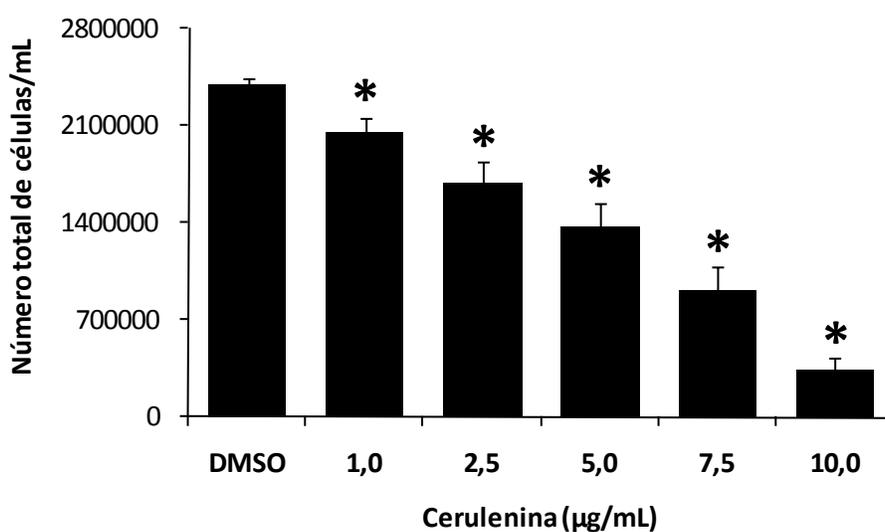
---

Os experimentos deste trabalho foram realizados com células da linhagem B16-F10, proveniente de melanoma murino. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as linhagens subcultivadas no máximo por 10 passagens e então descartadas. A linhagem B16-F10 é composta por células fusiformes, de citoplasma volumoso e com prolongamentos citoplasmáticos. A proliferação destas células é bastante rápida, sendo que esta característica e a morfologia das células foram alteradas após tratamento com concentrações crescentes de cerulenina (**Figura 4**).



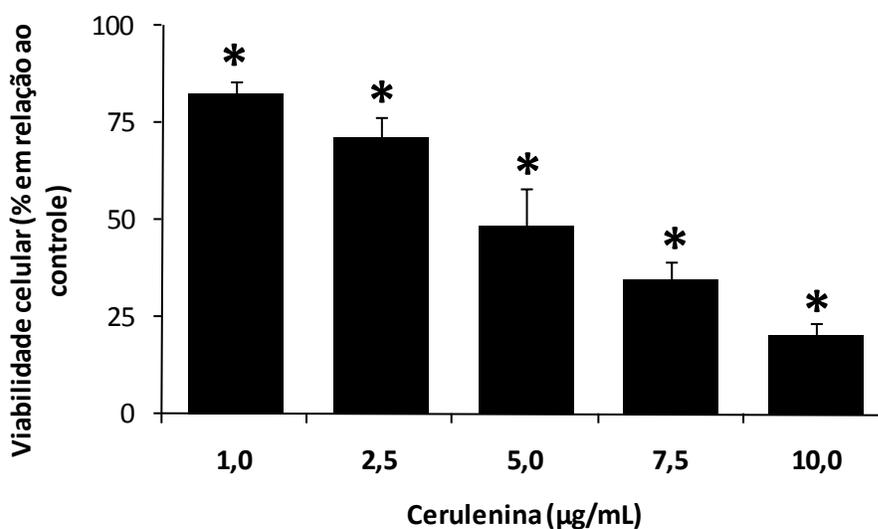
**Figura 4. Alterações morfológicas das células B16-F10 após 24 h de tratamento com concentrações crescentes de cerulenina. A:** Células controle (DMSO) e tratadas (C 5 µg/mL), exibindo núcleos arredondados e visíveis prolongamentos citoplasmáticos. **B:** Células controle (DMSO) e tratadas (C 7,5 µg/mL), estas com morfologia mais arredondada em relação ao controle. **C:** Células controle (DMSO) e tratadas (C 10 µg/mL), estas com redução dos prolongamentos citoplasmáticos e morfologia ainda mais arredondada em relação com controle, além de significativa diminuição do número de células.

Para avaliarmos os efeitos citotóxicos e antiproliferativos da cerulenina foram realizadas curvas de proliferação, conforme descrito no item 4.4 de *Materiais e Métodos*. O tratamento com o inibidor de FASN, cerulenina, reduziu a proliferação das células B16-F10, de maneira dose-dependente, como mostra a **Figura 5**, concordando com as observações feitas das células em cultura, utilizando microscópio de contraste de fase (**Figura 4**).



**Figura 5: A inibição de FASN com cerulenina reduziu o número total de células de melanoma B16-F10.** As células B16-F10 foram tratadas com doses crescentes de cerulenina por 24 h, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, somente as células aderidas foram coletadas e contadas em citômetro de fluxo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 4 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , cerulenina versus DMSO, teste  $t$  de Student.

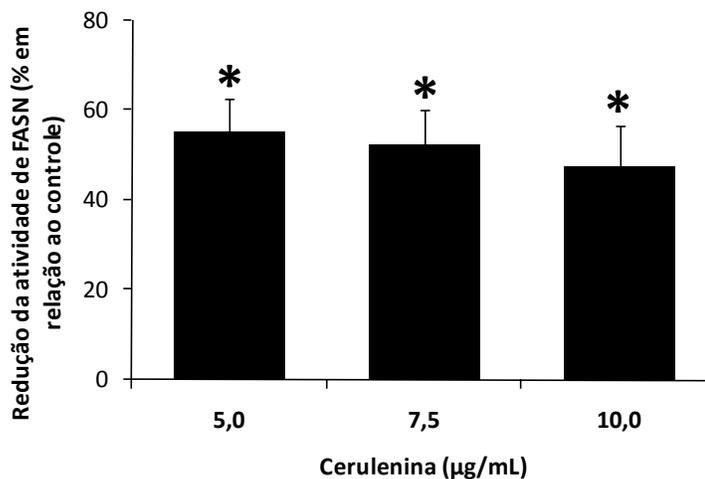
O sal *tetrazolium* é reduzido a *formazan* pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial de células viáveis, fazendo do ensaio de MTT um bom método para determinação da porcentagem de viabilidade/inviabilidade celular (Mosmann, 1983). Desse modo foi possível determinar que o tratamento com cerulenina reduziu a viabilidade das células B16-F10, de maneira dose-dependente em relação às células controle (**Figura 6**). Essa redução foi significativa a partir da dose mínima testada, de 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , a qual não induziu alterações morfológicas visíveis nas células em cultura, no período estudado de 24 h.



**Figura 6: A inibição de FASN com cerulenina reduz a viabilidade das células de melanoma B16-F10.** As células B16-F10 foram tratadas com doses crescentes de cerulenina por 24 h, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 5 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , cerulenina versus DMSO, teste *t* de Student.

Com base nas alterações morfológicas e nos resultados anteriormente mostrados, as condições experimentais estabelecidas para os demais experimentos foram tratamentos com 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL de cerulenina por 24 h.

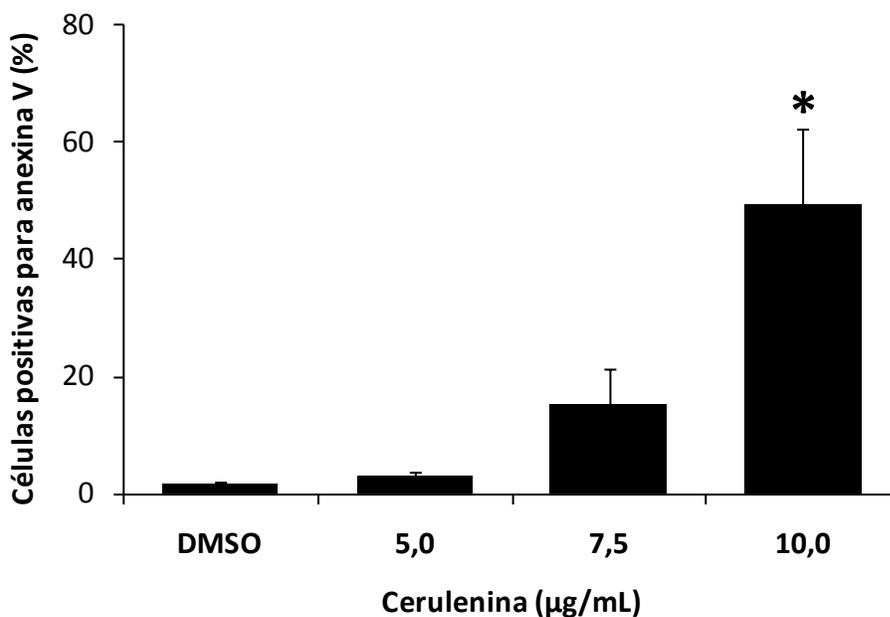
Em trabalho prévio de nosso grupo, mostramos o conteúdo de FASN expresso pelas células B16-F10, determinado por western blotting (Carvalho *et al.*, 2008). Uma vez verificado que o tratamento com cerulenina reduz a viabilidade das células de melanoma, foram realizados ensaios de lipogênese com água triciada ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ), a fim de se confirmar que os efeitos obtidos após o tratamento com o fármaco são mesmo decorrentes da redução da atividade enzimática de FASN. De fato, a **Figura 7** mostra redução significativa da atividade de FASN após 6 h de tratamento com diferentes concentrações de cerulenina, conforme demonstrado pela redução da lipogênese (Kridel *et al.*, 2004; Browne *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007).



**Figura 7: Cerulenina inibe a lipogênese em células de melanoma B16-F10.** As células B16-F10 foram plaqueadas e tratadas com concentrações crescentes de cerulenina, por 6 h. Lipogênese foi quantificada através da incorporação de água triciada ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, 3 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , cerulenina versus DMSO, teste  $t$  de Student.

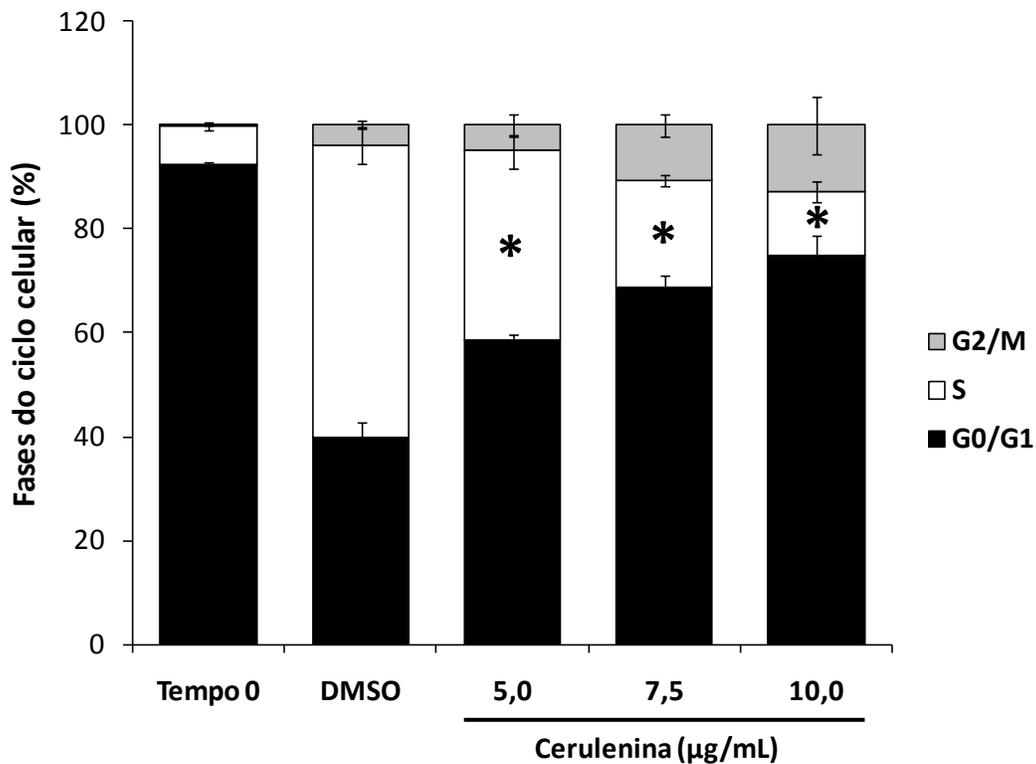
A literatura é unânime em demonstrar que a inibição de FASN resulta em morte por apoptose em diferentes linhagens de células tumorais (Pizer *et al.*, 1996a; 1996b; 1998; Furuya *et al.*, 1997; Kuhajada *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2004; 2005c). Em trabalho prévio de nosso grupo, mostramos que a inibição de FASN com orlistat induz apoptose nas células B16-F10 (Carvalho *et al.*, 2008). Desse modo, as porcentagens de células em apoptose foram estimadas após o tratamento com cerulenina, tendo em vista a redução de viabilidade causada pelo tratamento com esse inibidor de FASN (**Figura 6**). As células foram plaqueadas e tratadas como descrito anteriormente. Para determinação das taxas de apoptose, foram realizadas marcações com anexina V-FITC, conforme descrito no item

4.6 de *Materiais e Métodos*. A **Figura 8** mostra que o tratamento com 5,0 µg/mL de cerulenina, por 24 h, não induziu níveis significativos de apoptose, em relação ao seu controle. O tratamento com 7,5 µg/mL de cerulenina elevou em 8,1 vezes o número de células marcadas com anexina V, apesar de não ter sido estatisticamente significativo. Valores mais expressivos foram observados após tratamento com 10,0 µg/mL de cerulenina, o qual resultou em aumento de 26,5 vezes na porcentagem de células em apoptose, em relação ao controle.



**Figura 8: A inibição de FASN com cerulenina induz apoptose em células de melanoma B16-F10.** As células B16-F10 foram tratadas com doses crescentes de cerulenina por 24 h, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, a porcentagem de células em apoptose foi estimada após marcação com anexina V-FITC, em citômetro de fluxo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 5 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , cerulenina versus DMSO, teste  $t$  de Student.

A redução do número total de células B16-F10 após o tratamento com cerulenina (**Figura 5**) sugere redução na proliferação celular. Desse modo, foi determinada a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular, para cada grupo de extratos obtidos para as posteriores análises de western blotting. As células foram plaqueadas e, após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio novo, na ausência de SFB, a fim de se promover a sincronização das células em G0/G1. Como demonstrado na **Figura 9**, após 24 h de privação de SFB, cerca de 92,5% das células estavam em G0/G1 (barra *Tempo 0*). Completadas essas 24 h, o meio de cultura novamente foi trocado por meio novo, contendo 10% de SFB e as diferentes concentrações de cerulenina. Após mais 24 h de tratamento, as células foram coletadas e analisadas as fases do ciclo celular. A **Figura 9** mostra que o tratamento com cerulenina reduziu significativamente a proliferação das células B16-F10, demonstrada pela diminuição da porcentagem de células na fase S e aumento das células em G0/G1. Os tratamentos com 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL de cerulenina levaram a uma redução de 36,8; 64,4 e 78,5% das células na fase S, respectivamente, em relação aos seus controles.

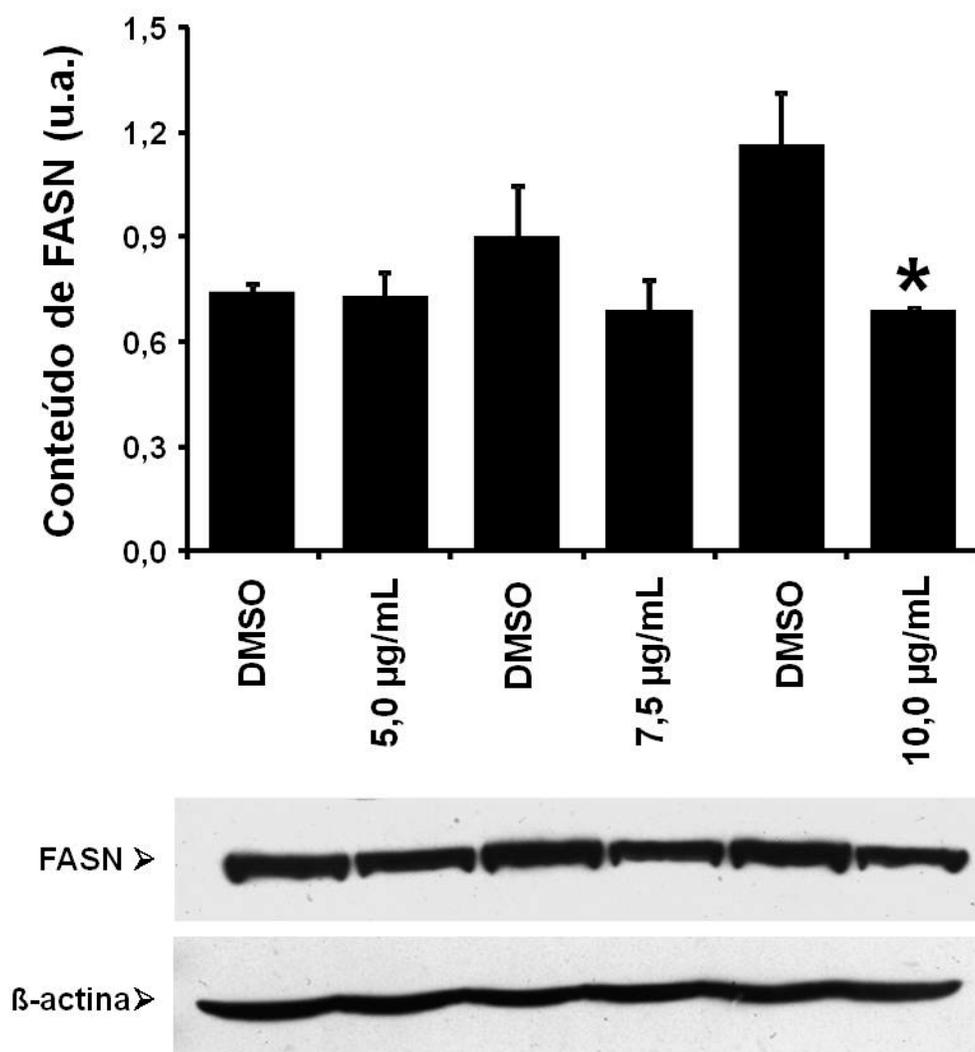


**Figura 9: A inibição de FASN reduz a proliferação das células de melanoma B16-F10.** As células B16-F10 foram plaqueadas, sincronizadas por 24 h (Tempo 0) e tratadas com concentrações crescentes de cerulenina, por 24 h. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada em citometria de fluxo após marcação com de iodeto de propídeo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , cerulenina versus DMSO, teste  $t$  de Student.

Para caracterizar de que maneira a inibição de FASN reduz a proliferação de células de melanoma B16-F10, foram analisados os efeitos da cerulenina sobre o conteúdo de diversas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular. Vale ressaltar que as células utilizadas nas análises de ciclo celular foram coletadas simultaneamente com as células utilizadas para a obtenção de cada extrato estudado.

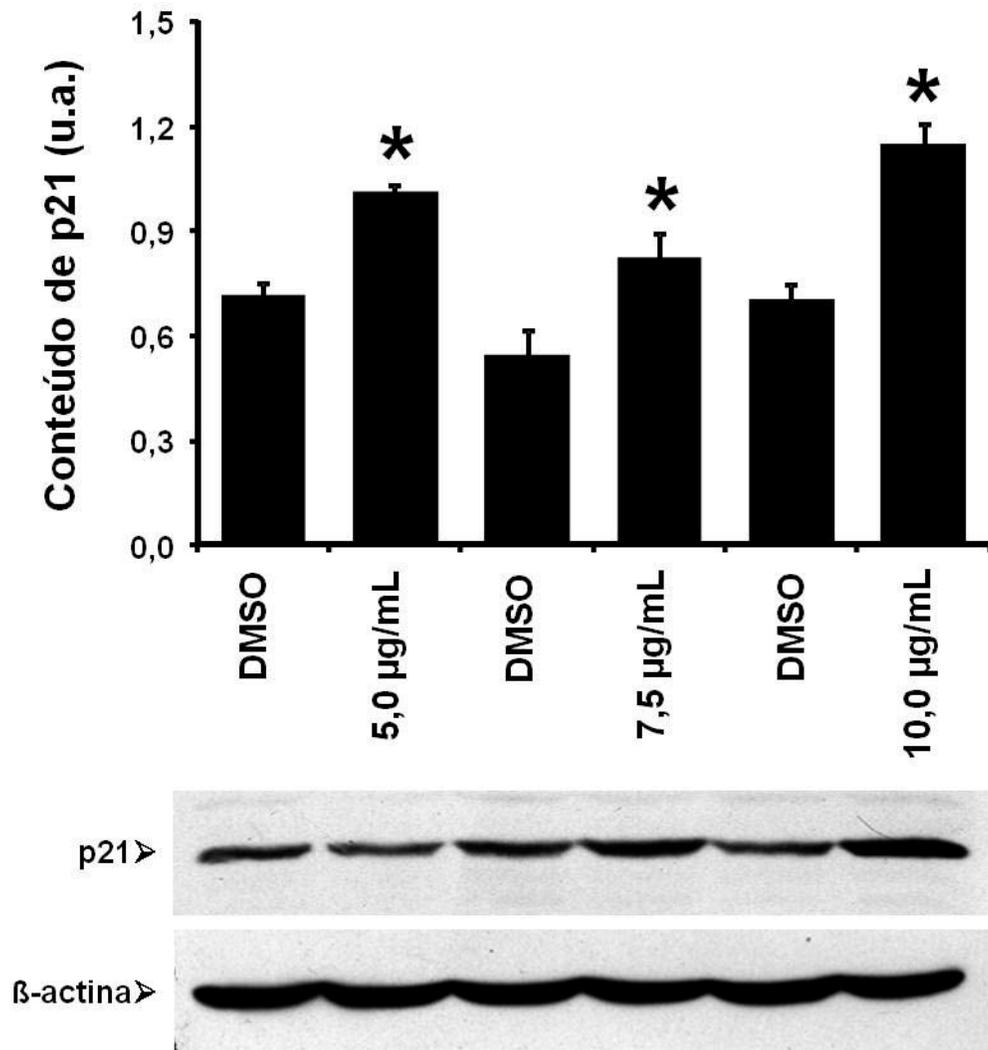
A primeira proteína analisada foi a própria FASN. Como demonstrado na **Figura 10**, o tratamento das células de melanoma B16-F10 com 5,0 µg/mL de cerulenina, por 24 h, não alterou os níveis de FASN. Uma discreta redução do conteúdo protéico pôde ser observada após tratamento com 7,5 µg/mL de cerulenina, porém a redução significativa de FASN ocorreu somente após tratamento com 10,0 µg/mL de cerulenina. Deste modo, 10,0 µg/mL de cerulenina não só inibiram a atividade enzimática de FASN (**Figura 7**), mas também reduziram sua disponibilidade para as células.

Conforme mencionado anteriormente, diversas são as proteínas que regulam o ciclo celular, incluindo a supressora de tumor p21<sup>WAF1/Cip1</sup>. Concordando com os dados mostrados na **Figura 9**, onde o tratamento com cerulenina resultou em inibição da proliferação celular, foi verificado aumento significativo dos níveis de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> nas três concentrações estudadas (**Figura 11**).



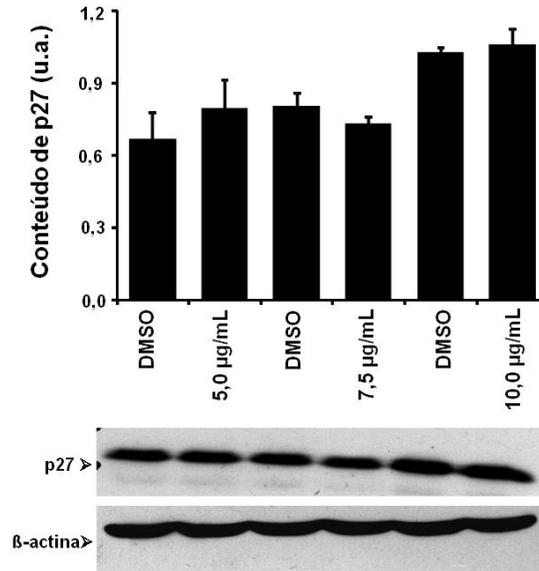
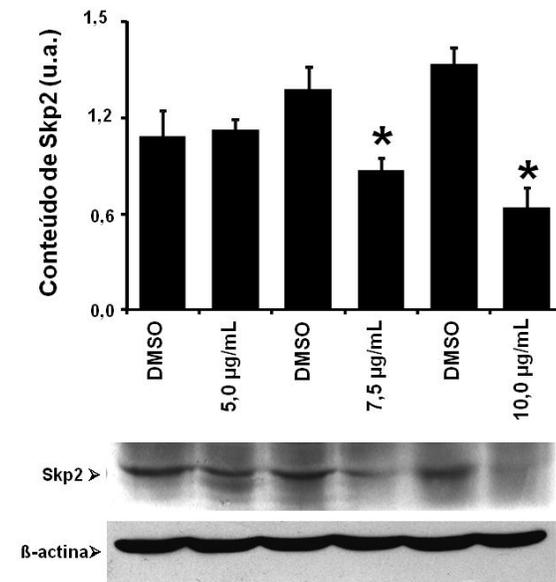
**Figura 10: Efeito do tratamento de células B16-F10 com cerulenina sobre o conteúdo de FASN.** As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL de cerulenina por 24 h. Em seguida foram realizados western blottings para checagem do conteúdo de FASN (1:3,000), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média ± EPM de 3 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , cerulenina versus DMSO, teste  $t$  de Student.

Imagem representativa encontra-se acima do gráfico.



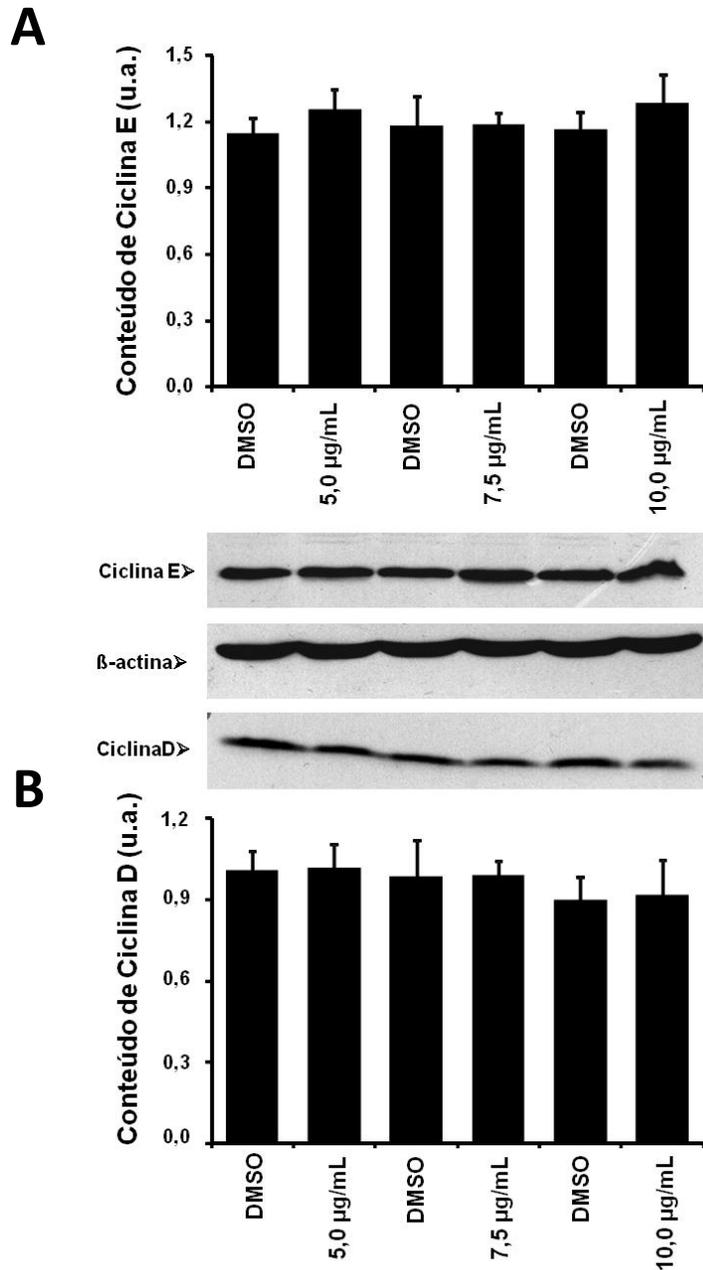
**Figura 11: Efeitos do tratamento de células B16-F10 com cerulenina sobre o conteúdo de p21<sup>WAF1/Cip1</sup>.** As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL de cerulenina por 24 h. Em seguida foram realizados western blotings para checagem do conteúdo de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (1:200), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média ± EPM de 3 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , cerulenina versus DMSO, teste  $t$  de Student. Imagem representativa encontra-se acima do gráfico.

p27<sup>kip1</sup> é um polipeptídeo membro da família Cip/Kip de inibidores de cdks, que inibem o ciclo celular em G1, agindo de maneira semelhante a p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (Polyak *et al.*, 1994; Soos *et al.*, 1996). Interessantemente, a inibição de FASN com cerulenina não alterou o conteúdo de p27<sup>kip1</sup> nas células de melanoma B16-F10 (**Figura 12 A**), apesar de verificada inibição da proliferação celular (**Figura 9**). Entretanto foi verificada redução significativa de Skp2, responsável pela degradação proteossômica de p27<sup>kip1</sup>, após tratamento com 7,5 e 10 µg/mL de cerulenina (**Figura 12 B**), sendo que esta redução pode ser um dos fatores responsáveis pelo acúmulo de células em G0/G1 (**Figura 9**).

**A****B**

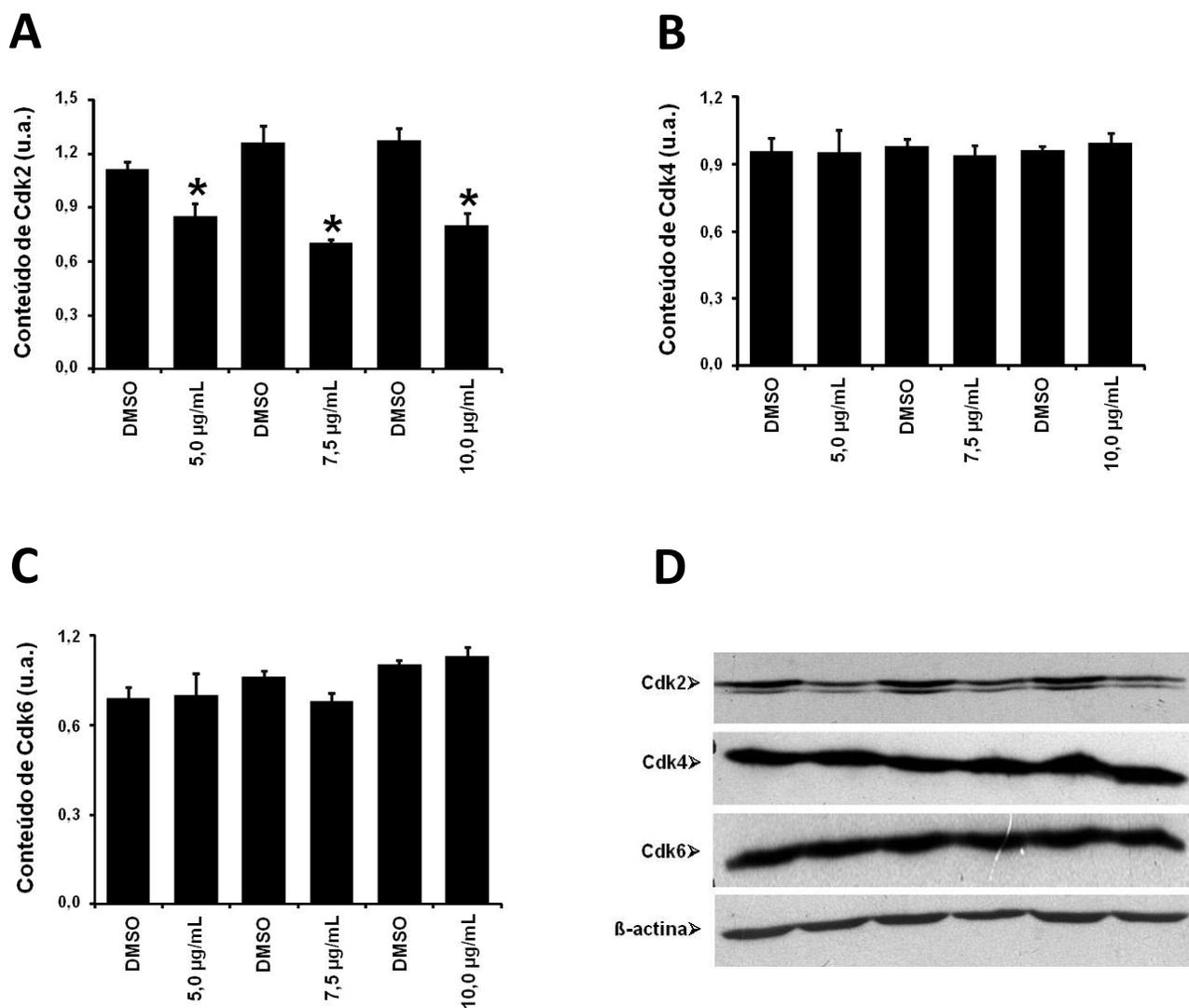
**Figura 12: Efeitos do tratamento de células B16-F10 com cerulenina sobre o conteúdo de p27<sup>Kip1</sup> e Skp2.** As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL de cerulenina por 24 h. Em seguida foram realizados western blottings para checagem do conteúdo de p27<sup>Kip1</sup> (1:500 - **A**) e Skp2 (1:1,000 - **B**), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média ± EPM de 3 experimentos distintos; \**p*<0,05, cerulenina versus DMSO, teste *t* de Student. Imagens representativas encontram-se acima de cada gráfico.

As ciclinas constituem um grupo diverso de proteínas que se acumulam durante a interfase e são destruídas na mitose, sendo que a ciclina E é necessária para a transição de G1 para S, por se ligar a cdk2 e a E2F (*para revisão ver Shapiro & Harper, 1999; Malumbres & Barbacid, 2009; Wickliffe et al., 2009*). Uma possível redução nos níveis de ciclina E era esperada, visto a inibição da proliferação das células B16-F10 (**Figura 9**). No entanto, o tratamento com cerulenina não alterou seu conteúdo protéico, em nenhuma das concentrações estudadas (**Figura 13 A**). Da mesma maneira, a inibição de FASN não alterou os níveis de outra importante ciclina para a transição G1-S, a ciclina D1, conforme demonstra a **Figura 13 B**. Também eram esperadas reduções no conteúdo de ciclina D1, uma vez que seus níveis caem rapidamente quando não há proliferação celular (*Neganova & Lako, 2008; Abbas & Dutta, 2009*).



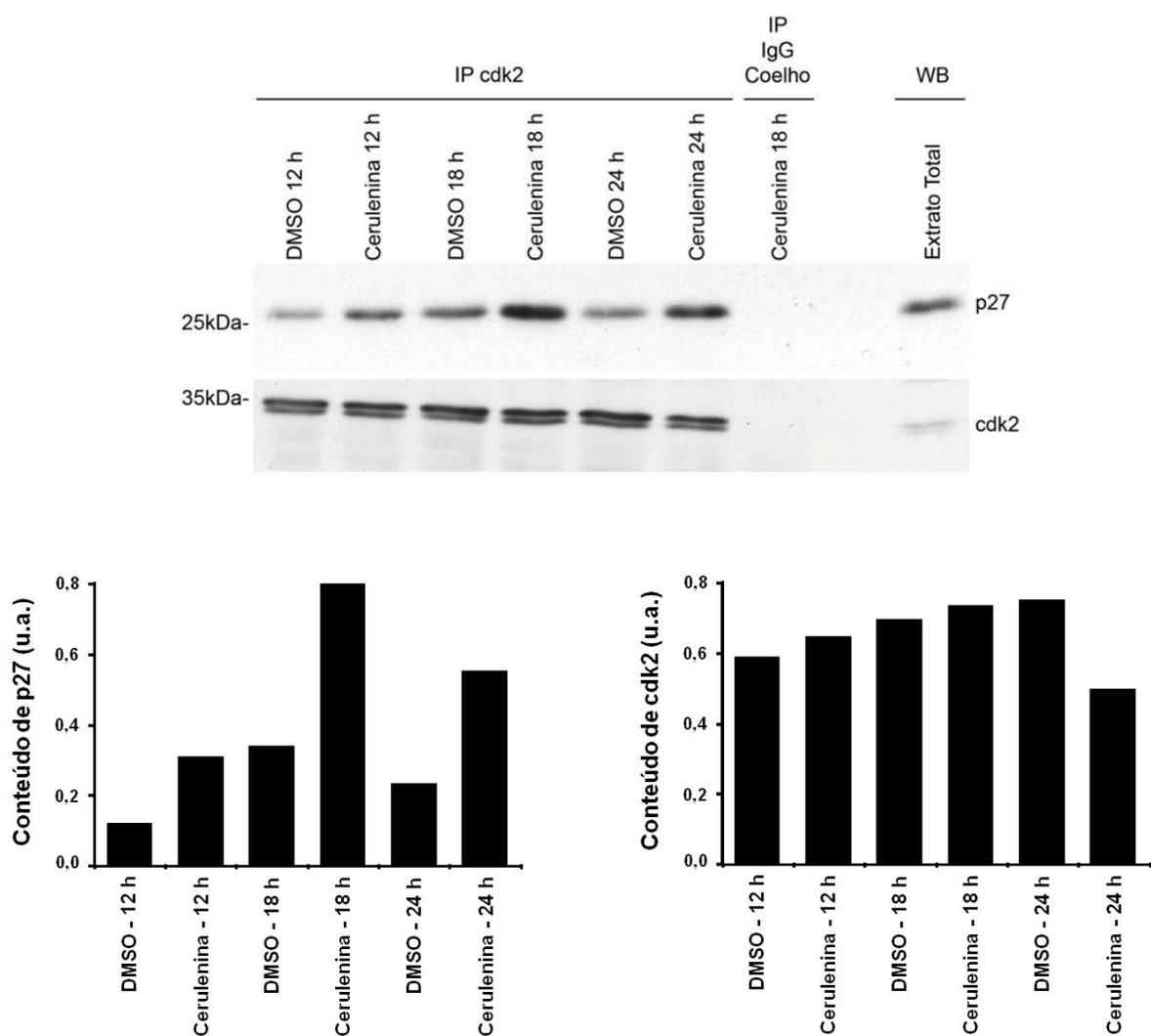
**Figura 13: Efeitos do tratamento de células B16-F10 com cerulenina sobre o conteúdo de ciclinas E e D1.** As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL de cerulenina por 24 h. Em seguida foram realizados western blottings para checagem do conteúdo de ciclina E (1:500 - **A**) e D1 (1:200 - **B**), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média ± EPM de 3 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , cerulenina versus DMSO, teste  $t$  de Student. Imagens representativas encontram-se acima de cada gráfico.

Conforme dito anteriormente, as cdk's são enzimas que agem a fim de promover a progressão do ciclo celular (Fecher *et al.*, 2009). Para dar início à fase S, é necessária a formação dos complexos ciclinaD/cdk4/6 e ciclina E/cdk2. Dentre as diversas cdk's, estudamos os efeitos da inibição de FASN sobre três: cdk2, cdk4 e cdk6. Cdk2 é uma quinase dependente de ciclinas (no caso, A e E), que desencadeia a passagem de G1 para S. Nas células de melanoma B16-F10 houve redução significativa dos níveis de cdk2 após tratamento com as três concentrações de cerulenina estudadas (**Figura 14 A**), justificando a inibição da proliferação das células B16-F10 (**Figura 9**). Na **Figura 14 A** nota-se a presença constante de 2 bandas para cdk2, as quais correspondem às suas formas ativa, desfosforilada (33 kDa) e inativa, fosforilada (30 kDa) (Dulić *et al.*, 1993). A inibição de FASN, reduziu os níveis das duas formas de cdk2. Por outro lado, o tratamento com cerulenina não alterou os níveis de outras quinases dependentes de ciclina, cdk4 e cdk6, como mostram as **Figura 14 B** e **C**, respectivamente. Os complexos formados por estas cdk's e ciclina D fosforilam Rb e desencadeiam a síntese de ciclina E (Malumbres & Barbacid, 2009). A ausência de alteração de seus conteúdos após inibição de FASN é interessante, uma vez que cdk4 e cdk6 também estão envolvidas com a continuidade da proliferação celular.



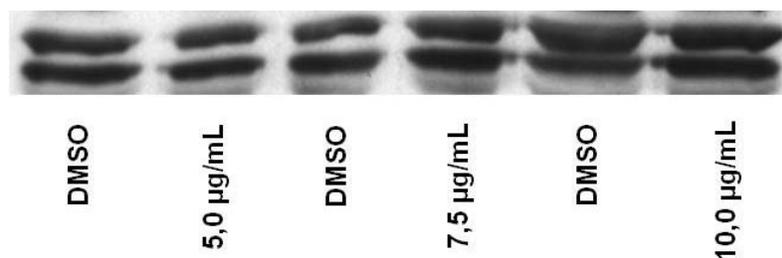
**Figura 14: Efeitos do tratamento de células B16-F10 com cerulenina sobre o conteúdo de cdk2, cdk4 e cdk6.** As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL de cerulenina por 24 h. Em seguida foram realizados western blottings para checagem do conteúdo de cdk2 (1:20,000 - **A**), cdk4 (1:50,000 - **B**) e D1 (1:500 - **C**), normalizados pelo conteúdo de beta-actina. Os valores representam a média ± EPM de 3 experimentos distintos; \* $p < 0,05$ , cerulenina versus DMSO, teste *t* de Student. Em **D**, imagens representativas dos western blottings de cada proteína estudada.

A inibição de FASN com cerulenina levou a uma redução dos níveis de cdk2, mas não de p27<sup>Kip1</sup> e ciclina E, nas células de melanoma B16-F10, conforme demonstrado nas **Figura 14 A**, **12 A** e **13 A**. Foram realizados experimentos de co-imunoprecipitação, a fim de detectar possível redução na formação dos complexos ciclinas/cdks. Esses experimentos foram realizados em colaboração com a pós-doutoranda Dr<sup>a</sup> Michelle Agostini, do Laboratório de Biologia Celular, da Área de Patologia da FOP-UNICAMP. Dados iniciais confirmam a redução do conteúdo de cdk2 (24 h) e mostram aumento tempo-dependente no conteúdo de p27<sup>Kip1</sup> após tratamento com 10,0 µg/mL de cerulenina (**Figura 15**). Apesar do conteúdo de p27<sup>Kip1</sup> não ter sido alterado após inibição de FASN (**Figura 12 A**), nesse método foi analisado o conteúdo de p27<sup>Kip1</sup> total, que poderia estar ou não ligado ao complexo ciclina E/cdk2. Já nas co-imunoprecipitações foi significativo o aumento de p27<sup>Kip1</sup> ligado a cdk2, o que contribui para a inibição da proliferação decorrente da inibição de FASN (**Figura 9**).



**Figura 15: O tratamento de células B16-F10 com cerulenina aumenta os níveis de p27<sup>Kip1</sup> e reduz de cdk2.** Extratos protéicos totais de células B16-F10 tratadas com 10 µg/mL de cerulenina ou DMSO por 12, 18 e 24 horas foram utilizados nos experimentos de co-imunoprecipitação (1 mg por amostra) com 3 µg de anticorpos anti-cdk2 ou 3 µg de IgG de coelho (controle negativo). Os imunoprecipitados foram aplicados em gel de poliacrilamida a 12% e transferidos para membrana de nitrocelulose, as quais foram submetidas a western blotting com anticorpos anti-p27<sup>Kip1</sup>. Vinte microgramas dos sobrenadantes dos imunoprecipitados da amostra tratada por 18 horas com cerulenina e do extrato protéico total também foram utilizados na reação de western blotting. Após realização de *stripping*, a membrana foi re-incubada com anticorpo anti-cdk2.

Como dito anteriormente, a proteína Rb precisa ser fosforilada por ciclinas/cdks (ciclina D1/cdk4, ciclina E/cdk2 ou ciclina A/cdk2) para que ocorra a passagem de G1 para S. Uma vez fosforilada, Rb se desliga de E2F, ativando a transcrição de proteínas necessárias para a progressão da fase S, como as ciclinas A e E (Li et al., 2006). Nossos resultados iniciais sugerem que a inibição de FASN com cerulenina não altera os níveis de Rb total (**Figura 16**), porém experimentos adicionais são necessários para uma melhor caracterização dos conteúdos de Rb total e fosforilado após inibição de FASN nas células B16-F10.



**Figura 16: Efeitos do tratamento de células B16-F10 com cerulenina sobre o conteúdo de Rb total.** As células B16-F10 foram plaqueadas, carenciadas por 24 h e tratadas com 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL de cerulenina por 24 h. Em seguida foram realizados western blottings para checagem do conteúdo de Rb total (1:200).

Para concluir, o gene supressor de tumor  $p16^{\text{Ink4a}}$ , que inibe o complexo ciclina D/cdk4 e reduz a fosforilação de Rb, inibindo a proliferação celular, está frequentemente mutado em melanomas (Li et al., 2006; Fecher et al., 2009; Mitra & Fisher, 2009). Experimentos prévios sugerem que o tratamento das células B16-F10 com cerulenina aumentou o conteúdo de  $p16^{\text{Ink4a}}$  nas três concentrações analisadas (*dados não mostrados*).

## 6 DISCUSSÃO

---

---

Aumento da expressão e atividade da enzima FASN foi detectado em diversos tumores, contribuindo para os altos índices proliferativos das células tumorais (Milgraum *et al.*, 1997; Alo *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2002; Pizer *et al.*, 1998; Vlad *et al.*, 1999; Piyathilake *et al.*, 2000; Visca *et al.*, 1999; Nemoto *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002; Visca *et al.*, 2003; Krontiras *et al.*, 1999; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005; Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2006). Desse modo, a inibição farmacológica da enzima FASN é seletivamente citotóxica para as células neoplásicas, resultando em inibição da progressão do ciclo celular, com significativa redução da proliferação e aumento das taxas de apoptose, e sugerindo forte correlação entre a atividade de FASN e o controle do ciclo celular. (Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005; Menendez *et al.*, 2006).

No presente trabalho, estudamos os efeitos da inibição farmacológica da enzima FASN sobre a proliferação de células de melanoma murino B16-F10, utilizando a cerulenina como inibidor de FASN. Mais especificamente, caracterizamos os efeitos da inibição de FASN sobre o conteúdo de algumas proteínas envolvidas na transição das fases G1 para S do ciclo celular.

Inicialmente foram analisados os efeitos antiproliferativos da cerulenina sobre as células tumorais B16-F10. A contagem do número total de células mostra que houve inibição significativa e dose-dependente da proliferação, a partir de 1,0 µg/mL de cerulenina. Trabalho prévio de nosso grupo também mostrou efeitos inibitórios de 5,0 µg/mL de cerulenina sobre a proliferação de células derivadas de carcinoma espinocelular

de boca ([Agostini et al., 2004](#)). Assim sendo, nossos resultados estão de acordo com a literatura, que mostra inibição da proliferação em diferentes linhagens celulares diante da inibição da enzima FASN ([Pizer et al., 1998](#); [Li et al., 2001](#); [Ho et al., 2007](#)).

A redução do número total de células B16-F10 foi acompanhada pela redução da viabilidade celular, conforme mostram os resultados obtidos com o ensaio de MTT. Da mesma maneira, tais achados concordam com trabalhos prévios ([Menendez et al., 2004b](#); [Menendez et al., 2005](#); [Ho et al., 2007](#)), incluindo células B16-F10 tratadas com orlistat ([Carvalho et al., 2008](#)). É importante ressaltar que as alterações morfológicas observadas só foram visíveis a partir dos tratamentos de 5,0 µg/mL de cerulenina, o que justifica os demais experimentos terem sido realizados com as concentrações de 5,0; 7,5 e 10 µg/mL.

Essa redução de viabilidade celular é decorrente de morte por apoptose, o que já foi previamente mostrado em outras linhagens tumorais, utilizando diferentes inibidores da enzima FASN ([Menendez et al., 2004](#); [Zhou et al., 2007](#)). Recentemente mostramos que, após a inibição de FASN, as células B16-F10 morrem exclusivamente por apoptose e não por necrose ou autofagia ([Zecchin et al., 2010](#)), assim conforme sugerido para células de tumores gástricos tratadas com orlistat ([Dowling et al., 2009](#)). No presente trabalho, quantificamos a porcentagem de apoptose nas células B16-F10 nas condições experimentais estabelecidas. Desse modo, verificamos que o tratamento com 5,0 µg/mL de cerulenina por 24 h não induziu níveis significativos de apoptose, em relação ao seu controle. Já o tratamento com 7,5 µg/mL de cerulenina elevou em 8,1 vezes o número de células marcadas com anexina V, enquanto 10,0 µg/mL de cerulenina aumentaram em 26,5 vezes a porcentagem de células em apoptose.

O próximo passo foi verificar os efeitos destas concentrações de cerulenina sobre a progressão do ciclo celular, uma vez que a inibição de FASN inibe a proliferação de diversas linhagens tumorais, justamente por inibir a síntese de ácidos graxos necessários

à síntese de membranas (Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Chirala *et al.*, 2003, Menendez *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2010). Em nossos experimentos, o tratamento com cerulenina reduziu significativamente a proliferação das células B16-F10 conforme demonstrado pela diminuição da porcentagem de células na fase S e aumento das células em G0/G1. Interessantemente, o mesmo tratamento com 5,0 µg/mL de cerulenina que não induziu morte, reduziu em 37% a proliferação das células B16-F10. A mesma observação é válida para a concentração de 7,5 µg/mL, a qual induziu baixos índices de apoptose, mas inibiu 65% da proliferação celular. Tais dados sugerem, portanto, que a inibição de FASN primeiramente resulta em inibição da proliferação, para posteriormente induzir apoptose nas células de melanoma B16-F10.

Diante da redução da proliferação e da viabilidade celular após tratamento com cerulenina, realizamos experimentos para confirmar se os efeitos obtidos foram realmente decorrentes da redução da atividade enzimática de FASN. Ensaios de lipogênese com água triciada mostraram redução significativa e semelhante da atividade de FASN após 6 h de tratamento com as três concentrações de cerulenina testadas (Carvalho *et al.*, 2008; Murata *et al.*, 2010). A redução da lipogênese foi significativa a partir de 5,0 µg/mL de cerulenina, embora esta inibição da atividade enzimática de FASN não tenha resultado em apoptose. A redução da atividade de FASN foi semelhante para as três concentrações estudadas, embora os efeitos das mesmas sobre a proliferação e apoptose tenham sido distintos. Como estes foram vistos após 24 h de tratamento, é possível que nesse tempo maior, os níveis de inibição de FASN tenham sido diferentes daqueles vistos com apenas 6 h de tratamento, para os ensaios de lipogênese. Reforçando essa hipótese, verificamos que somente 10,0 µg/mL de cerulenina reduziram os níveis protéicos de FASN após 24 h de tratamento, conforme visto por western blotting. Para essa concentração, a cerulenina não só inibiu a atividade de FASN como também reduziu seus níveis nas células B16-

F10, concordando com a literatura em que a redução dos níveis protéicos está associada à redução da atividade enzimática (Li *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).

As diferenças entre inibição da proliferação e apoptose podem ser explicadas pela ordem dos acontecimentos diante da inibição da enzima FASN. Segundo Menendez e Lupo, o primeiro efeito da inibição de FASN é a parada do ciclo celular com diminuição da proliferação tumoral, e só posteriormente há apoptose (Menendez & Lupo, 2007). De acordo com essa afirmação, Pizer *et al.* analisaram a incorporação de timidina ao DNA após a inibição de FASN com cerulenina e C75 em algumas linhagens de células de carcinoma de cólon e de leucemia. Os resultados mostraram inibição da replicação do DNA após 2 h de tratamento, enquanto a fragmentação cromossomal, um sinal característico da apoptose, não foi detectada antes de 6 h de exposição aos inibidores de FASN (Pizer *et al.*, 1998).

Analisamos, por western blotting, os efeitos da inibição de FASN sobre algumas proteínas envolvidas na transição das fases G0/G1 para S do ciclo celular, já que os resultados mostraram acúmulo de células nas fases G0/G1.

O primeiro complexo formado com a finalidade de fosforilar a proteína Rb e dar início ao processo de progressão do ciclo celular é constituído por ciclina D/cdk4/cdk6 e neste momento p21<sup>WAF1/Cip1</sup> e p27<sup>Kip1</sup> são co-fatores positivos para a progressão do ciclo celular afetando a atividades das ciclinas D, E e A (Li *et al.*, 2006; Masamha, 2009; van Riggelen & Felsher, 2010). Houve aumento significativo de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> nas células de melanoma B16-F10 tratadas com cerulenina, assim como verificado demonstrado em células RKO, de câncer de cólon (Li *et al.*, 2001) e em células A-375, de melanoma humano (Ho *et al.*, 2007), resultando em menor proliferação. Em células TCA, de carcinoma espinocelular bucal, a cerulenina foi responsável por inibir a palmitoilação de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> e, portanto, reduziu a proliferação celular (Zhang *et al.*, 2005).

Apesar de não ter ocorrido aumento dos níveis totais de p27<sup>Kip1</sup>, o tratamento com 10,0 µg/mL de cerulenina resultou em aumento do conteúdo de p27<sup>Kip1</sup> co-precipitado com cdk2. Aumento de p27<sup>Kip1</sup> foi detectado em células de carcinoma de estômago, após inibição de FASN com orlistat (Menendez *et al.*, 2005). Mutações e deleções homozigotas no gene que codifica p27 são raras em melanomas, embora a metilação, processo pelo qual um grupo metil é adicionado ao gene, possa alterar a expressão da proteína p27<sup>Kip1</sup>, causando seu silenciamento transcricional (Li *et al.*, 2006). Desse modo, o aumento da regulação de p27<sup>Kip1</sup> age como um mecanismo de sobrevivência para as células de melanoma, por inibir a morte por apoptose (Li *et al.*, 2006). A inibição ou silenciamento de p27<sup>Kip1</sup> tem o propósito de inibir sua atividade de cki, permitindo a proliferação excessiva de células tumorais. Sendo assim, o aumento do conteúdo desta proteína ligada a cdk2 demonstra que a inibição de FASN ativa importantes mecanismos de combate à proliferação desordenada das células de melanoma B16-F10. Paralelamente, vimos redução significativa de Skp2, envolvida diretamente na ubiquitinação e degradação de p27<sup>Kip1</sup> (Li *et al.*, 2006), após tratamento com cerulenina, assim como visto por Carvalho *et al.* (2008), em células B16-F10 tratadas com orlistat. Em células de melanoma, o aumento da proliferação associado à diminuição da expressão de p27<sup>Kip1</sup> pode ser explicado pelo constante aumento da expressão de Skp2, embora alguns trabalhos não tenham conseguido fazer esta associação (Li *et al.*, 2006). Concluímos, então, que o tratamento com cerulenina além de preservar a atividade de cki da proteína p27<sup>Kip1</sup> impediu que esta fosse ubiquitinada pela proteína Skp2.

O tratamento com cerulenina não alterou o conteúdo das proteínas ciclina D1, cdk4 e cdk6. É possível que os níveis aumentados de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> resultem em inibição da atividade dos complexos ciclina D/ckd4/ckd6 (Li *et al.*, 2006), necessários para

fosforilação e inativação de Rb progressão na fase S (Li *et al.*, 2006), o que poderia explicar o fato do nível destas proteínas não ter sido alterado. Entretanto, sabe-se que a cerulenina reduz o conteúdo de ciclina D1 conforme demonstrado em células SK-Br3, de câncer de mama (Menendez *et al.*, 2004). Apesar do gene que codifica p16 apresentar-se mutado ou deletado na maioria das linhagens celulares de melanoma, vale lembrar que p16<sup>Ink4a</sup> é uma cki que tem como alvos principais as proteínas cdk4 e cdk6, ou seja, em condições normais e/ou diante de uma progressão desregulada do ciclo celular, esta proteína inibe a ativação das proteínas cdk4 e cdk6 pela ciclina D, impedindo assim a progressão do ciclo celular (Ellis *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006).

O complexo ciclina E/cdk2 desempenha papel essencial para a transição G1-S, embora alguns trabalhos tenham sugerido que essas proteínas desempenhem papéis independentes, possivelmente no controle da replicação do DNA (Coulonval *et al.*, 2003; Geng *et al.*, 2007). A deficiência de genes que codificam ciclinas E1 e E2 é letal para embriões de camundongos, como resultado de defeitos placentários, o que não ocorre na deficiência de genes que codificam cdk2 (Geng *et al.*, 2003; Parisi *et al.*, 2003). Apesar da inibição da proliferação decorrente da inibição de FASN não ter alterado o conteúdo de ciclina E, os níveis de cdk2 mostraram-se reduzidos. Lembrando que cdk4 e cdk6 contribuem para a ativação de cdk2 por dois mecanismos, sendo o primeiro a parcial fosforilação de Rb que libera E2F desencadeando a síntese de ciclina E que por sua vez ativa cdk2, e o segundo pela ligação do complexo ciclina D/cdk4 e 6 aos potentes inibidores de cdk2, p21<sup>WAF1/Cip1</sup> e p27<sup>kip1</sup> sem perder a atividade de quinase (Carnero, 2002; Neganova, 2008). Além disso, há aumento da expressão de ciclina E e cdk2 na progressão de melanomas, sendo que o tratamento de linhagens tumorais de melanoma,

com inibidores de cdk2 também reduz a proliferação e induz parada das células em G1 (Fecher *et al.*, 2009), assim como verificamos com a cerulenina.

Correlacionando os dados apresentados, podemos sugerir que a inibição de FASN com cerulenina resultou em inibição da proliferação das células de melanoma B16-F10 através do seguinte mecanismo: o aumento de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> pode ser o responsável pela inibição dos complexos ciclina D/cdk4 e 6, impedindo que houvesse fosforilação e ativação de Rb. Uma vez não fosforilado, Rb não teria sido capaz de estimular a síntese de ciclina E em quantidade suficiente para ativar cdk2, a qual apresentou-se diminuída em nosso modelo. Paralelamente, a redução de Skp2 sugere ausência de ubiquitinação e degradação de p27<sup>Kip1</sup>, o que pode ter permitido a esta proteína inibir o complexo ciclina E/cdk2 e, portanto, inibir a progressão do ciclo celular.

Em conjunto estes resultados demonstram que a inibição de FASN primeiramente altera os níveis de proteínas envolvidas na transição de G1 para S, tais como p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> e Skp2, e posteriormente induz apoptose em células de melanoma murino B16-F10.

## **7 CONCLUSÕES**

---

---

- ✓ *O tratamento de células de melanoma B16-F10 com cerulenina reduz a proliferação e induz apoptose de maneira dose-dependente.*
- ✓ *A inibição de FASN aumenta os níveis protéicos de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> total e de p27<sup>Kip1</sup> co-imunoprecipitado com cdk2, em células de melanoma B16-F10.*
- ✓ *O tratamento com cerulenina reduz os níveis protéicos de FASN, Skp2 e cdk2, em células de melanoma B16-F10, sem alterar o conteúdo de cdk4, cdk6, Rb total, ciclina D1 e ciclina E.*
- ✓ *A inibição de FASN com cerulenina primeiramente altera os níveis de proteínas envolvidas na transição de G1 para S e posteriormente induz apoptose em células de melanoma murino B16-F10.*

## ***REFERÊNCIAS\****

---

---

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Abbas T, Dutta A. p21 in câncer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(6): 400-14.

Agostini M, Silva SD, 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: 728-35.

Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L *et al*. Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol*. 2005; 76(2): 272-8.

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): 1383-8.

Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SK, Hirota S, Hosobe S *et al*. Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006; 66(11): 5934-40.

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.

Barton MC, Akli S, Keyomarsi K. Deregulation of Cyclin E Meets Dysfunction in p53: Closing the Escape Hatch on Breast Cancer *J Cell Physiol*. 2006; 209(3): 686-94.

---

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

Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Cdk2 Knockout Mice Are Viable. *Curr Biol*. 2003; 13(20): 1775-85.

Bligh EG e Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37(8): 911-7.

Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem*. 2003; 278(28): 25752-7.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 7(72): 248-54.

Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence *J Biol Chem*. 1993; 268(19): 14490-6.

Brink J, Ludtke SJ, Yang CY, Gu ZW, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(1): 138-43.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997; 89(3): 331-40.

Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(20): 11041-8.

Browne CD, Hindmarsh EJ, Smith JW. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J*. 2006; 20(12):2027-35.

Bucher N, Britten CD. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer*. 2008; 98(3): 523-8.

Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(9): 671-82.

Carnero A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2002; 87(2): 129-33.

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

Chajès V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V. Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res*. 2006; 66(10): 5287-94.

Chalbos D, Chambon M, Ailhaud G, Rochefort H. Fatty acid synthetase and its mRNA are induced by progestins in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1987; 262(21): 9923-6.

Chiariello M, Esposito G. Skp2 Modulates Cyclic Nucleotides Antiproliferative Effects. *Circ Res*. 2006; 98(9): 1113-4.

Chirala SS, Jayakumar A, Gu ZW, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(6): 3104-8.

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 U S A*. 2003; 100(11): 6358-63.

de Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*. 1993; 363(6430): 595-602.

Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4, and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet Cell Genet*. 1994; 66(1): 72-4.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, *et al.* Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001; 412(6849): 822-6.

Dowling S, Cox J, Cenedella RJ. Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. *Lipids*. 2009; 44(6): 489-98.

Dulić V, Drullinger LF, Lees E, Reed SI, Stein GH. Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(23): 11034-8.

Ellis M, Chew YP, Fallis L, Freddersdorf S, Boshoff C, Weiss RA, et al. Degradation of p27Kip inhibitor triggered by Kaposi's sarcoma virus cyclin-cdk6 complex. *EMBO J.* 1999; 18(3): 644-53.

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): 81-6.

Fecher LA, Amaravadi RK, Schuchter LM, Flaherty KT. Drug targeting of oncogenic pathways in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009; 23(3): 599-618.

Fisk HA, Winey M. The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication. *Cell.* 2001; 106(1): 95-104.

Fukasawa K. p53, Cyclin-dependent Kinase and Abnormal Amplification of Centrosomes. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1786(1): 15-23.

Fukuda H, Noguchi T, Iritani N. Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene and ATP citrate-lyase gene by Sp1 and Sp3 in rat hepatocytes(1). *FEBS Lett.* 1999; 464(3): 113-7.

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): 4589-93.

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): 686-92.

Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S *et al.* Cyclin E ablation in the mouse. *Cell.* 2003; 114(4): 431-43.

Geng Y, Lee YM, Welcker M, Swanger J, Zagozdzon A, Winer JD *et al.* Kinase-independent function of cyclin E. *Mol Cell.* 2007; 25(1): 127-39.

Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ *et al.* The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell.* 2004; 5(3): 253-61.

Grossel MJ, Baker GL, Hinds PW. cdk6 can shorten G(1) phase dependent upon the N-terminal INK4 interaction domain. *J Biol Chem.* 1999; 274(42): 29960-7.

- Grossel MJ, Hinds PW. From Cell Cycle to Differentiation. An Expanding Role for cdk6. *Cell Cycle*. 2006; 5(3): 266-270.
- Guerciolini R. Mode of action of orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997; 21(3): S12-23.
- Hata T, Sano Y, Matsumae A, *et al*. Study of new antifungal antibiotic. *Jpn J Bacteriol*. 1960; 15: 1075-1077.
- Heemers H, Maes B, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endocrinol*. 2001; 15(10): 1817-28
- Heiligttag SJ, Bredehorst R, David KA. Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. *Cell Death Differ*. 2002; 9(9): 1017-25.
- Hershko DD. Oncogenic Properties and Prognostic Implications of the Ubiquitin Ligase Skp2 in Cancer. *Cancer*. 2008; 112(7): 1415-24.
- Ho TS, Ho YP, Wong WY, Chi-Ming Chiu L, Wong YS, Eng-Choon Ooi V. Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother*. 2007; 61(9): 578-87.
- Hochegger H, Takeda S, Hunt T. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? 2008; 9(11): 910-6.
- Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans*. 2002; 30(Pt 6): 1091-5.
- Ibrahim N, Haluska FG. Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4: 551-79.
- Instituto Nacional de Câncer- INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, [acesso 2010 Jun 01]. Disponível em URL:<http://www.inca.gov.br/estimativas/2006>.
- Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiane V, Silipo V, La Torre G *et al*. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2003; 30(1): 23-8.

Jackowski S, Wang J, Baburina I. Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1483(3): 301-15.

Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, *et al*. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(19): 8695-9.

Jon H. Chung, Fred Bunz Chung JH, Bunz F. Cdk2 Is Required for p53-Independent G2/M Checkpoint Control. *PLoS Genet*. 2010; 6(2): e1000863.

Joyce NC, Harris DL. Decreasing expression of the G1-phase inhibitors, p21Cip1 and p16INK4a, promotes division of corneal endothelial cells from older donors. *Mol Vis*. 2010; 16: 897-906.

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

Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001; 2(4): 282-6.

Keyomarsi K, Conte D Jr, Toyofuku W, Fox MP. Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene*. 1995; 11(5): 941-50.

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; 16;279(29):30540-5.

Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M *et al*. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell*. 1991; 66(6): 1217-28.

Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, *et al*. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*. 1992; 257(5077): 1689-94.

Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*. 2004; 64(6): 2070-5.

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): 325-9.

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 U S A.* 2000; 97(7): 3450-4.

Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res.* 2003; 63(1): 132-9.

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): 71-9.

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.

Levin MS, Talkad VD, Gordon JI, Stenson WF. Trafficking of exogenous fatty acids within Caco-2 cells. *J Lipid Res.* 1992; 33(1): 9-19.

Li W, Sanki RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, McCarthy SW *et al.* The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology.* 2006; 38(4): 287-301.

Li JN, Gorospe M, Chrest FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WF *et al.* Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res.* 2001; 61(4): 1493-9.

Lin J, Hocker TL, Singh M, Tsao H. Genetics of melanoma predisposition. *Br J Dermatol.* 2008; 159(2): 286-91.

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(3): 1262-9.

Liu X, Shi Y, Giranda VL, Luo Y. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA-MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(3): 494-501.

Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, *et al.* Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med.* 1997; 3(2): 231-4.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science.* 2000; 288(5475): 2379-81.

Lupo 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.

Ma T, Van Tine BA, Wei Y, Garrett MD, Nelson D, Adams PD, Wang J *et al.* Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev.* 2000; 14(18): 2298-313.

Macleod KF. The Role of the RB tumour suppressor pathway in oxidative stress responses in the haematopoietic system. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(10): 769-81.

Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1(3): 222-31.

Malumbres M, Barbacid. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30(11): 630-41.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(3): 153-66.

Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G *et al.* Cyclin-dependent kinases: a family portrait *Nat Cell Biol.* 2009; 11(11): 1275-6.

Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 Degradation Is Sufficient to Induce G1 Cell Cycle Arrest despite Constitutive Expression of Cyclin E2 in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* 2009; 69(16): 6565-72.

Matsuda Y, Ichida T p16 and p27 are functionally correlated during the progress of hepatocarcinogenesis *Med Mol Morphol.* 2006; 39(4): 169-75.

Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res.* 1953; 13(1): 27-9.

Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R *et al.* Inhibition of fatty acid synthase (FAZ) 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. Orlistat: from antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB-2)-overexpressing gastrointestinal tumors? *Exp Biol Med (Maywood).* 2005a; 230(3): 151-4.

Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol.* 2005b; 16(8): 1253-67.

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

Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C *et al.* A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* 1992; 11(8): 2909-17.

Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997; 3 (11): 2115-20.

Mitra D, Fisher DE. Transcriptional regulation in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009; 23(3): 447-65.

Moroy T, Geisen C. Cyclin E. *Int J Bioch Cell Biol.* 2004; 36(8): 1424-39.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.

Mumberg D, Wick M, Bürger C, Haas K, Funk M, Müller R. Cyclin ET, a new splice variant of human cyclin E with a unique expression pattern during cell cycle progression and differentiation. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25(11): 2098-105.

Murata S, Yanagisawa K, Fukunaga K, Oda T, Kobayashi A, Sasaki R *et al*. Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci*. 2010; 101(8): 1861-5.

Naliwaiko K, Luvizon AC, Donatti L, Chammas R, Mercadante AF, Zanata SM, Nakao LS. Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway. *Chem Biol Interact*. 2008; 173(2): 122-8.

Neganova I, Lako M. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *J Anat*. 2008; 213(1): 30-44.

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

Nurse P. Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Eur J Cancer*. 1997; 33(7): 1002-4.

Ohtsubo M, Roberts JM. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science*. 1993; 259(5103): 1908-12.

Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(5): 2612-24.

Omura S The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol Rev*. 1976; 40(3): 681-97.

Ookhtens M, Kannan R, Lyon I, Baker N. Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *Am J Physiol*. 1984; 247(1 Pt 2): R146-53.

Parisi T, Beck AR, Rougier N, McNeil T, Lucian L, Werb Z *et al*. Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J*. 2003; 22(18): 4794-803.

Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC *et al.* The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol.* 2000; 31(9): 1068-73.

Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1996a; 56(12): 2745-7.

Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res.* 1996b; 56(6): 1189-93.

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 Res.* 1998; 58(20): 4611-5.

Pollard TD, Earnshaw WC. *Biologia Celular.* 1. ed. São Paulo: Elsevier; 2006.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 1994; 8(1): 9-22.

Ragan VS, Joshi AK, Smith S. Mapping the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation in vitro. *Biochemistry.* 2001; 40(36): 10792-9.

Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N *et al.* Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003; 3(5): 573-85.

Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T *et al.* Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res.* 2003; 1(10): 707-15.

Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Dei Tos AP, Fletcher JA *et al.* Gastrointestinal stromal tumours overexpress fatty acid synthase. *J Pathol.* 2006; 209(3): 369-75.

Schrump DS, Chen GA, Consuli U, Jin X, Roth JA. Inhibition of esophageal cancer proliferation by adenovirally mediated delivery of p16INK4. *Cancer Gene Ther.* 1996; 3(6): 357-64.

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 Oncol.* 2004; 40(7): 688-96.

Sgambato A, Zhang YJ, Arber N, Hibshoosh H, Doki Y, Ciaparrone M *et al.* Deregulated expression of p27(Kip1) in human breast cancers. *Clin Cancer Res.* 1997; 3(10): 1879-87.

Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest.* 1999; 104(12): 1645-53.

Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(24): 13656-61.

Smith S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* 1994; 8(15): 1248-59.

Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res.* 2003; 42(4): 289-317.

Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A *et al.* Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ.* 1996; 7(2):135-46.

Stoops JK, Wakil SJ. Animal fatty acid synthetase. A novel arrangement of the beta-ketoacyl synthase sites comprising domains of the two subunits. *J Biol Chem.* 1981; 256(10): 5128-33.

Sutherland RL, Musgrove EA. CDK inhibitors as potential breast cancer therapeutics: new evidence for enhanced efficacy in ER+ disease. *Breast Cancer Res.* 2009; 11(6): 112.

Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res.* 1997; 57(6): 1086-90b.

Swinnen JV, Ulix W, Heyns W, Verhoeven G. Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(24): 12975-80.

- Swinnen JV, Heemers H, Deboel 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*. 2000; 19(45): 5173-81.
- Swinnen JV, Heemers H, Heyns W, Verhoeven G. Androgen regulation of lipogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2002; 506(Pt A): 379-87.
- 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): 2204-12.
- Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci*. 2007; 98(5): 629-35.
- Tsukamoto, Y., H. Wong. The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. *J Biol Chem*, 1983; 258(24): 15312-22.
- van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. 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(3): 642-6.
- van de Sande T, Roskams T, Lerut E, Joniau S, Van Poppel H, Verhoeven G *et al*. High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. *J Pathol*. 2005; 206(2): 214-9.
- van Riggelen J, Felsher DW. Myc and a Cdk2 senescence switch. *Nat Cell Biol*. 2010; 12(1): 7-9.
- Vlad DH, Ighes-Mullol J, Maher JV. Velocity-jump instabilities in Hele-Shaw flow of associating polymer solutions. *Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*. 1999; 60(4 Pt B): 4423-30.
- Visca P, Alò PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F *et al*. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res*. 1999; 5(12): 4111-8.

Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, 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): 335-9.

Vodermaier HC. APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol.* 2004; 14(18): R787-96.

Wakil SJ. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry.* 1989; 28(11): 4523-30.

Waltregny D, Leav I, Signoretti S, Soung P, Lin D, Merk F *et al.* Androgen-driven prostate epithelial cell proliferation and differentiation in vivo involve the regulation of p27. *Mol Endocrinol.* 2001; 15(5): 765-82.

Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization *J Biol Chem.* 1993; 268(19): 14497-504.

Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Korber E *et al.* Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1986; 367(9): 905-12.

Wickliffe K, Williamson A, Jin L, Rape M. The multiple layers of ubiquitin-dependent cell cycle control. *Chem Rev.* 2009; 109(4): 1537-48.

Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology.* 2001; 61(S2): 1-13.

Zambell KL, Fitch MD, Fleming SE. Acetate and butyrate are the major substrates for de novo lipogenesis in rat colonic epithelial cells. *J Nutr.* 2003; 133(11): 3509-15.

Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, Melo DR, Alberici LC, Oliveira HCF *et al.* Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. *Lab Invest*, 2010 (*epub ahead of print*).

Zhang Y, Guo C, Yu G. A pilot study of fatty acid metabolism in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34(1): 78-81.

Zhao J, Dynlacht B, Imai T, Hori T, Harlow E. Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes Dev.* 1998; 12(4): 456-61.

Zhao J, Kennedy BK, Lawrence BD, Barbie DA, Matera AG, Fletcher JA, Harlow E. NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev.* 2000; 14(18): 2283-97.

Zhou W, Han WF, Landree LE, Thupari JN, Pinn ML, Bililign T *et al.* Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67(7): 2964-71.