

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

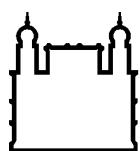
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**MECANISMOS ASSOCIADOS A OBESIDADE E CARCINOGENESE: PAPEL DA
LEPTINA E CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO
LIPÍDICO E PROGRESSÃO TUMORAL**

NARAYANA P. B. FAZOLINI

RIO DE JANEIRO
Março, 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NARAYANA P. B. FAZOLINI

Mecanismos associados a obesidade e carcinogênese: papel da leptina e corpúsculos lipídicos na regulação do metabolismo lipídico e progressão tumoral

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza
Prof. Dra. Clarissa M. Maya-Monteiro

RIO DE JANEIRO
Março, 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

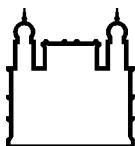
F287 Fazolini, Narayana P. B.

Mecanismos associados a obesidade e carcinogênese: papel da leptina e corpúsculos lipídicos na regulação do metabolismo lipídico e progressão tumoral / Narayana P. B. Fazolini. – Rio de Janeiro, 2015.
xv,170 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.
Bibliografia: f. 84-106

1. Corpúsculos lipídicos. 2. Leptina. 3. mTOR. I. Título.

CDD 612.01577



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Narayana P. B. Fazolini

Mecanismos associados a obesidade e carcinogênese: papel da leptina e corpúsculos lipídicos na regulação do metabolismo lipídico e progressão tumoral

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza
Prof. Dra. Clarissa M. Maya-Monteiro

Aprovada em:

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Vinícius Cota (Presidente)
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Prof. Dra. Maria Isabel Doria
Prof. Dra. Miriam Werneck (revisor e suplente)
Prof. Dra. Christianne Bandeira Melo (suplente)

Rio de Janeiro, 16 de março de 2015

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Faço um agradecimento especial às minhas orientadoras, Patrícia e Clarissa, exemplos de competência e dedicação, pelo apoio, entusiasmo e carinho durante todo este período. Agradeço por compartilhar experiência e conhecimento, proporcionando desta forma meu crescimento pessoal e profissional.

Outro agradecimento especial deve ser feito ao Dr. João Viola, pelo grande auxílio para o desenvolvimento deste trabalho e pela perspicácia durante nossas discussões.

Agradeço imensamente ao Dr. Richard Hemmi Valente por me receber no laboratório de proteômica e por sua importante contribuição nos experimentos, análises de proteômica e discussões.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pela orientação e pelos inigualáveis esforços a fim de proporcionar este momento em minha vida.

Agradeço ao meu eterno esposo Eduardo por sempre estar ao meu lado, pelo incentivo e por me mostrar o caminho nos momentos difíceis. Continuamos a crescer e a vencer juntos cada etapa mesmo sem sua presença carnal.

À minha irmã, Caroline, por seu amor e companhia em todos os momentos.

Ao Dr. Hugo Caire Castro-Faria-Neto por ter me recebido no laboratório, com disposição para ajudar sempre e ajuda nas discussões.

À Dra. Adriana Ribeiro, Dra. Adriana Vallochi, Dra. Cecília Almeida e Dr. Valber Frutuoso pelas discussões, ideias e pelo companheirismo no desenvolvimento desta dissertação.

À Patrícia Elaine de Almeida, amiga querida e companheira. Obrigada por compartilhar comigo teu conhecimento e por sua amizade. Você foi de suma importância para este momento.

Às minha grandes amigas Gi e Nat, pessoas excepcionais, de enorme coração e que levarei para o resto da vida. Sally, Carlinha e Jú, pessoas com as quais tive o prazer de conviver, sempre dispostas a ajudar e que se tornaram amigas e confidentes pessoais. À Pat Reis, Flora, Bel, Mari, Rachel, Surrage e Zanon, pelos conselhos, conversas e pela amizade.

A amiga Rose, por ser uma pessoa tão solidária, estando sempre disposta a ajudar. Por seu carinho e apoio nos momentos de tensão e por todos momentos de distração no laboratório.

A todos do laboratório de imunofarmacologia, pelo apoio, incentivo e amizade durante todo este período.

A todos do departamento de fisiologia e farmacodinâmica, pelo suporte na disponibilização de materiais e a fim de proporcionar meu crescimento científico nas discussões de seminários e reuniões.

A todos os colegas do grupo corpúsculos lipídicos, pela união, parceria, amizade e discussões sempre produtivas e instigantes. Obrigada pela convivência harmoniosa e colaboração.

Ao grupo leptina, Sally, Glau, Lohanna e Jéssica pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de trabalho do laboratório de biologia celular do Instituto Nacional de Câncer, pela colaboração, sugestões e apoio ao desenvolvimento deste trabalho, em especial a Dra. Miriam Werneck e Dr. André Cruz pelas discussões, auxílios e amizade.

Ao laboratório de toxinologia pelo apoio e suporte ao desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Dr. Jonas Perales e ao Dr. Richard Hemmi Valente pelas discussões, orientações e apoio na execução deste projeto. Também agradeço a Dra. Monique Trugilho, Dr. André Ferreira, Dra. Karina Rebello, Joelma, Viviane Bastos e Monique Costa pela ajuda constante.

À plataforma tecnológica de Espectrometria de massas por todo o suporte laboratorial para a realização deste trabalho.

Ao Setor de Produção e Tratamento de Imagens do IOC/Fiocruz, pelo tratamento das figuras dos artigos deste trabalho.

Aos professores do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular da Fiocruz, pelas aulas ministradas que contribuíram para a minha aprendizagem.

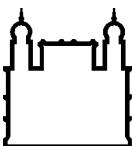
A todas as pessoas, amigos e familiares, que, de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq, FAPERJ, CAPES, PAPES-FIOCRUZ, INCT-INCA.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Obesidade e Câncer	5
1.1.1 Dados epidemiológicos	5
1.1.2 Adipocinas	9
1.1.3. mTOR	16
1.1.4. Corpúsculos lipídicos.....	20
2. OBJETIVOS	32
2.1. Geral	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Cultura de células	33
3.2. Cultura de células e estímulo <i>in vitro</i>	33
3.3. Tratamentos com inibidores de mTOR e Fk-506	33
3.4. Coloração e contagem de corpúsculos lipídicos.....	34
3.5. Lise celular e dosagem de proteínas	34
3.6. Western Blotting.....	34
3.7. Dosagem de PGE ₂	35
3.8. Dosagem de citocinas e quimiocinas.....	36
3.9. Localização subcelular de COX-2 por microscopia de fluorescência	36
3.10 Localização subcelular de S6K e mTOR por microscopia confocal	37
3.11. Análise da proliferação celular por cristal violeta.....	37
3.12. Isolamento de corpúsculos lipídicos por fracionamento subcelular.....	38
3.13. Análises de ciclo celular e conteúdo de DNA sub-G0 por iodeto de propídio	39
3.14. Análise de ciclo celular por incorporação de BrdU	39
3.15. Marcação e quantificação de corpúsculos lipídicos por Oil Red O	40
3.16. Dosagem de proteínas pelo método Qubit	40
3.17. Digestão tríptica para análise por shotgun (nLC-MSMS)	40
3.18. IEF em sistema OFFGEL off-line com coluna RP-10 cm acoplada ao espetrômetro de massas LTQ-Orbitrap XL	41
3.19 Análise estatística	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Leptina induz a formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais	43
4.2. Avaliação da fosforilação de P70S6K em células epiteliais durante a estimulação com leptina.....	44

4.3 Leptina induz aumento da síntese de PGE ₂ , CINC-1 e TGF-β em células epiteliais intestinais	45
4.4. Análise da participação da via de mTOR na sinalização de leptina em células epiteliais intestinais	48
4.5. Mecanismos envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais induzidos por leptina	50
4.6. Papel da leptina e via de mTOR na expressão de COX-2 e TGF-β	52
4.7. Papel da leptina e via de mTOR na proliferação e crescimento celular	53
4.8. Proteínas da via de mTOR estão localizadas em corpúsculos lipídicos de linhagens de adenocarcinoma de cólon.....	58
4.9. Análise qualitativa de células de adenocarcinoma de cólon utilizando plataforma de análise shotgun: OFFGEL off-line com RP-10 cm/LTQ-Orbitrap XL	62
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8. ANEXOS	97
8.1 Tabela	97



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

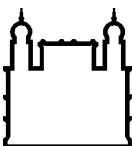
Mecanismos associados a obesidade e carcinogênese: papel da leptina e corpúsculos lipídicos na regulação do metabolismo lipídico e progressão tumoral

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Narayana P. B. Fazolini

A obesidade é uma condição predisponente ao desenvolvimento de câncer de cólon, esôfago, pulmão, próstata, dentre outros. Um dos maiores desafios no estabelecimento da ligação de obesidade e o risco de câncer tem sido correlacionar a epidemiologia e sua base biológica, ou seja, o mecanismo pelo qual a obesidade leva ao desenvolvimento de câncer. A leptina é uma adipocitocina, produzida e secretada pelo tecido adiposo que possui além dos efeitos em nível central no controle da saciedade, ações na regulação da resposta imune e inflamatória. Temos por hipótese que os níveis elevados de leptina na obesidade ative vias de sinalização envolvidas na regulação da inflamação, metabolismo lipídico e proliferação celular em células epiteliais. Os corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas envolvidas no metabolismo lipídico e inflamação, e o aumento no número destas organelas foi observado no câncer de cólon humano. A mTOR é uma serina/treonina cinase que está relacionada com o estímulo à tradução de proteínas, proliferação celular e progressão tumoral. Nossa objetivo foi, portanto, estudar o papel da leptina na alteração do metabolismo lipídico e progressão tumoral. Células epiteliais intestinais (IEC-6) não-transformadas de rato foram incubadas com leptina por 6h, na presença ou ausência do inibidor de mTOR, rapamicina. O estímulo com leptina induziu aumento na formação de corpúsculos lipídicos em células IEC-6 quando comparadas às células controle após coloração com tetróxido de ósmio ou ORO. O pré-tratamento com rapamicina inibiu显著mente a indução de corpúsculos lipídicos por leptina, sugerindo um papel de mTOR na sinalização induzida por esta adipocina. Nós demonstramos que a leptina aumenta a fosforilação de S6K em um mecanismo sensível à rapamicina. Além, disso, a leptina aumenta a proliferação de células epiteliais de forma dependente da via de mTOR, aumentando o número de células na fase S do ciclo celular. Através de proteoma descritivo de corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon, verificamos a presença de 370 proteínas, incluindo diversas proteínas importantes no metabolismo lipídico, tradução de proteínas, sinalização e proliferação celular, sugerindo que estas organelas podem ser sítios de tradução de proteínas e sinalização, e poderiam contribuir para o fenótipo hiperproliferativo observado em tumores. Através de fracionamento subcelular e microscopia confocal, validamos que corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon são sítios de localização da proteína S6K e mTOR. O estudo da regulação e ativação de mTOR e outras importantes vias durante processos patológicos como o câncer poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos básicos de regulação do metabolismo lipídico e transformação celular de células tumorais. Dessa forma, nossos estudos podem contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mechanisms involved in the obesity and cancer association: Role of leptin and lipid droplets in the regulation of lipid metabolism and tumor progression

Abstract

TESE DE DOUTORADO

Narayana P. B. Fazolini

Obesity is a predisposing condition to cancer development in colon, esophagus, lung, prostate, among others. One of the greatest challenges in establishing the link between obesity and the risk of cancer has been to establish the mechanism by which obesity leads to the development of cancer. Leptin is an adipocytokine, produced and secreted by adipose tissue that beyond its central effects in the control of satiety, has actions in the regulation of immune and inflammatory response. We hypothesized that elevated levels of leptin in obesity activate signaling pathways involved in the regulation of inflammation, lipid metabolism and cell proliferation in epithelial cells. Lipid droplets are dynamic organelles involved in lipid metabolism and inflammation, and the increase in the number of these organelles was observed in human colon cancer. mTOR is a serine / threonine kinase that regulates protein translation, cell proliferation and tumor progression. Our goal was therefore to study the impact of leptin in changes in lipid metabolism and tumor progression. Non-transformed rat intestinal epithelial cells (IEC-6) were incubated with leptin for 6h in the presence or absence of the mTOR inhibitor, rapamycin. Leptin stimulation induced increase in lipid droplet formation in IEC-6 cells when compared to control cells after staining with osmium tetroxide or ORO. Pre-treatment with rapamycin significantly inhibited the induction of lipid droplet by leptin, suggesting a role for mTOR in leptin-induced signaling. Leptin treatment leads to an increase in the phosphorylation of S6K in a rapamycin-sensitive manner. In addition, leptin-induced increase in epithelial cell proliferation is dependent of mTOR. Through descriptive proteomics of lipid droplets from colon adenocarcinoma cells, we identified 370 proteins, several of them involved in lipid metabolism, translation, cell signaling and proliferation, suggesting that these organelles can be sites of protein translation, contributing to the hyperproliferative phenotype observed in tumors. We have also demonstrated by confocal microscopy and subcellular fractionation that the S6K protein and mTOR are located at lipid droplets in colon adenocarcinoma cells. The study of regulation and activation of mTOR and other important pathways for diseases like cancer may contribute to a better understanding of the basic mechanisms involved in lipid metabolism and cell transformation in tumor cells, thus permitting the identification of new therapeutic targets for treatment of cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AO	Ácido oleico
ADRP	Proteína relacionada à diferenciação de adipócitos
AMPK	Proteína cinase dependente de AMP
Akt	Proteína cinase Akt/ Proteína cinase B
ATP	Trifosfato de adenosina
COX	Ciclooxygenase
eIF4E	Fator eucariótico de iniciação da tradução 4E
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
FAS	Ácido graxo sintase
FKBP	Proteína ligadora de FK-506
HIF	Fator induzido por hipoxia
IARC	Agência Internacional de pesquisa em câncer
IFN- γ	Interferon – gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	Proteína de ligação a IGF
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
IL	Interleucina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JAK	Janus cinase
KDa	Quilodaltons
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LO	Lipoxygenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MCP	Proteína quimioatraente de monócitos/macrófagos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Ministério da saúde
mTOR	Proteína cinase alvo da rapamicina de mamíferos
mTORC	Complexo de mTOR
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPY	Neuropeptídeo Y
ORO	Oil red O
OxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
p53	Proteína 53
p38	Proteína cinase ativada por mitógenos
PAT	Família composta por perilipina, ADRP e TIP47
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PG	Prostaglandina
PK	Proteína cinase
PL	Fosfolipase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos

PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
RAS	Subfamília de pequenas GTPases
SOCS	Supressor da sinalização de citocina
S6K	Proteína cinase S6
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TIP47	Proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons
Th	Linfócitos T helper
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSC	Complexo da esclerose tuberosa
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
WCRF	Fundação de pesquisa mundial em câncer
4EBP	Proteína ligadora de eIF4E
OMS	Organização Mundial da Saúde

Sumário

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e câncer	1
1.1.1 Dados epidemiológicos	1
1.1.2 Adipocinas	4
1.1.2.1 Leptina	6
1.1.2.2 Leptina e câncer	10
1.1.3 mTOR	13
1.1.4 Obesidade, metabolismo lipídico e câncer	17
1.1.4.1 Corpúsculos lipídicos	18
1.1.4.2 Estrutura e morfologia	19
1.1.4.3 Biogênese de corpúsculos lipídicos	20
1.1.4.4 Composição e possíveis funções de corpúsculos	24
1.1.4.5 Regulação de corpúsculos lipídicos no câncer	26
1.1.4.6 Proteômica de corpúsculos lipídicos	27

2. OBJETIVOS

2.1 Geral	34
2.2 Objetivos específicos	34

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células	35
3.2 Cultura de células e estímulo in vitro	35
3.3. Tratamentos com inibidores de mTOR	36
3.4. Coloração e contagem de corpúsculos lipídicos	36
3.5. Lise celular e dosagem de proteínas	36
3.6. Western Blotting	37
3.7. Dosagem de PGE2	38
3.8. Dosagem de citocinas e quimiocinas	38
3.9. Localização subcelular de COX-2 por microscopia defluorescência	39
3.10. Localização subcelular de S6K e mTOR por microscopia confocal	39
3.11. Análise da proliferação celular por cristal violeta	40
3.12. Isolamento de corpúsculos lipídicos por fracionamento subcelular	40
3.13. Análises de ciclo celular e conteúdo de DNA sub-G0 por iodeto de propídio	41
3.14. Análise de ciclo celular por incorporação de BrdU	42
3.15. Marcação e quantificação de corpúsculos lipídicos por Oil Red O	42
3.16. Análise estatística	43
3.17. Dosagem de proteínas pelo método Qubit	43
3.18. Preparação de digestos trípticos para análise por espectrometria de massas	43
3.19. Identificação de proteínas por nanocromatografia acoplada à espectrometria de massas de alta resolução	44
3.20. Interactoma ou mapa de interações de proteínas	45

4. RESULTADOS

4.1. Leptina induz a formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais	46
4.2. Avaliação da fosforilação de P70S6K em células epiteliais durante a estimulação com leptina	49
4.3. Leptina induz aumento da síntese de PGE2, CINC-1 e TGF- β em células epiteliais intestinais	51
4.4. Análise da participação da via de mTOR na sinalização de leptina em células epiteliais intestinais	51
4.5. Mecanismos envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais induzidos por leptina	54
4.6. Papel da leptina e via de mTOR na expressão de COX-2 e TGF- β	54
4.7. Papel da leptina e via de mTOR na proliferação e crescimento celular	57
4.8. Análise qualitativa preliminar de células de adenocarcinoma de cólon utilizando uma abordagem proteômica shotgun simplificada	57
4.9. Análise da rede de interação de proteínas (Interactoma) descritas no proteoma de corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon	60
4.10. Proteínas da via de mTOR estão localizadas em corpúsculos lipídicos de linhagens de adenocarcinoma de cólon	69
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
8. ANEXOS	
8.1 Tabela 8.1	107
8.2 Capítulo de livro	108
8.3 Artigo submetido	109
8.4 Revisão em fase final de preparação	138

1. INTRODUÇÃO

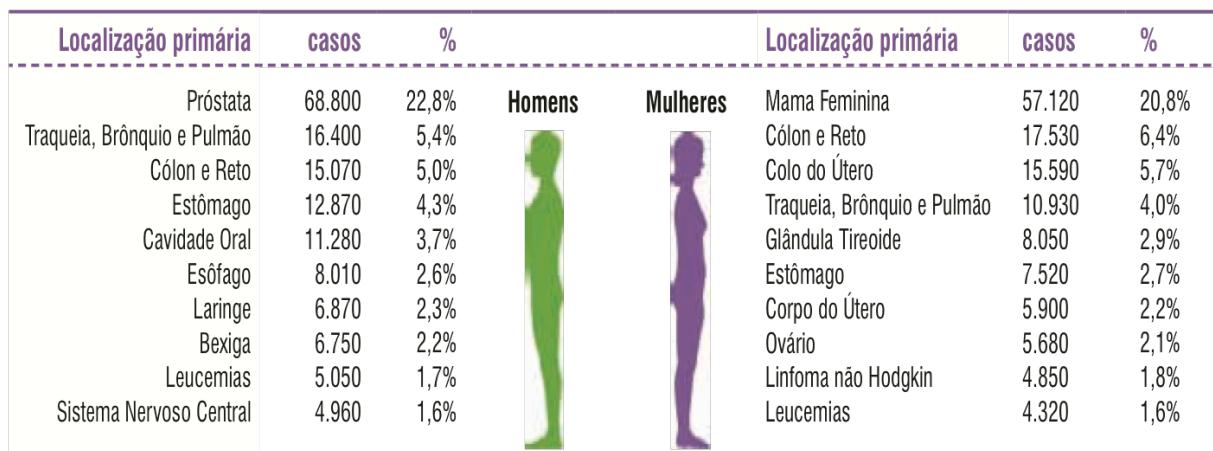
1.1 Obesidade e Câncer

1.1.1 Dados epidemiológicos

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês International Agency for Research on Cancer) juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer no mundo e um total de 8,2 milhões de mortes no ano de 2012. A incidência de câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Nesses últimos, os tipos de câncer mais frequentes, em ordem, na população masculina foram próstata, pulmão, cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres. O câncer colo-rectal é o terceiro tipo de câncer mais comum em homens (746 mil casos) e o segundo em mulheres (614 mil casos) em todo mundo. A mortalidade relacionada a este tipo de câncer é baixa (694 mil mortes), havendo mais mortes nas regiões menos desenvolvidas do mundo, refletindo assim a pior sobrevivência nestas regiões (IARC/OMS, 2012). Em 2030, a incidência global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer de uma forma geral, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento.

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide. Estimam-se, para 2014, no Brasil, 15.070 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 17.530 em mulheres (Fig. 1.1). Esses valores correspondem a um risco estimado de 15,44 casos novos a cada 100 mil homens e 17,24 a cada 100 mil mulheres. Essa neoplasia é considerada de bom prognóstico se a doença for diagnosticada em estágios iniciais. Um estudo do INCA apontou, para o câncer

de cólon e reto, uma sobrevida aproximada de 55%. É incontestável que o câncer é hoje, em todo mundo, um problema de saúde pública, cujos controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões, desde as mais desenvolvidas – cultural, social e economicamente – até às mais desiguais.



*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 1.1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes na população brasileira estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira neste ano, seguido pelos tumores de próstata, mama, colón e reto, pulmão, estômago e colo do útero. INCA, 2014.

Em consequência de uma mudança econômica, social e tecnológica, algumas populações mundiais se encontram em ambientes caracterizados por dieta hipercalórica e baixa atividade física. Sendo assim, a obesidade está rapidamente atingindo proporções epidêmicas em algumas partes do mundo, se tornando desta forma um grave problema de saúde pública (GUNTER e LEITZMANN, 2006). A Organização mundial de saúde estima que mais de 1,4 bilhão de adultos em todo mundo se encontram acima do peso. Destes, cerca de 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres são de fato obesos (WHO, 2008). Já está bem descrito que o excesso de tecido adiposo está associado à disfunção deste tecido, o que pode predispor indivíduos a desenvolver diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares. Adicionalmente, os indivíduos que estão com sobrepeso (IMC 25,0-29,9 kg /m²), ou que são obesos (IMC ≥30 kg / m²), possuem maior risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer (SCHERER *et al.*, 2014). Dados epidemiológicos sugerem uma importante associação entre o aumento do índice de massa corporal (IMC) e o desenvolvimento de câncer de mama (pós-menopausa) (KEY *et al.*, 2003; ARENDT *et al.*, 2013), cólon (OKABAYASHI *et al.*, 2012), próstata (MACINNIS *et al.*,

and ENGLISH, 2006), esôfago (LOFDAHL *et al.*, 2011), pâncreas (LI *et al.*, 2009), dentre outros (LICHTMAN, 2010).

Tipo de câncer	Homens	Mulheres
Mama	ND	1.12 (1.08–1.16)
Côlon	1.24 (1.20–1.28)	1.09 (1.05–1.13)
Endométrio	NA	1.59 (1.50–1.68)
Esôfago	1.52 (1.33–1.74)	1.51 (1.31–1.74)
Fígado	1.24 (1.15–1.34)	1.34 (1.25–1.43)
Leucemia	1.08 (1.02–1.14)	1.17 (1.04–1.32)
Melanoma	1.17 (1.05–1.30)	0.96 (0.92–1.01)
Mieloma	1.11 (1.05–1.18)	1.11 (1.07–1.15)
Linfoma não-hodgkins	1.06 (1.03–1.09)	1.07 (1.00–1.14)
Pâncreas	1.07 (0.93–1.23)	1.12 (1.02–1.22)
Próstata	1.03 (1.00–1.07)	NA
Reto	1.09 (1.06–1.12)	1.02 (1.00–1.05)
Tireóide	1.33 (1.04–1.70)	1.14 (1.06–1.23)

Tabela 1.1 - Associação entre obesidade e aumento do risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Dados epidemiológicos sugerem uma significante associação entre o aumento do índice de massa corporal (IMC) e câncer hematológico, pâncreas, próstata, mama na pós-menopausa, côlon, dentre outros. ND: Não determinável / NA: Não se aplica. Adaptado de KHANDEKAR *et al.*, 2011.

Tanto estudos clínicos quanto pré-clínicos indicam que o aumento da adiposidade está associada ao aumento na incidência de câncer, além de aumento da morbidade e mortalidade (PAREKH *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2011). No entanto, apesar da forte evidência epidemiológica de que a obesidade causa aumento do risco de câncer e da mortalidade, os mecanismos por trás desta associação ainda não estão esclarecidos (BARLOW *et al.*, 2006; CALLE *et al.*, 2003). Três fatores principais são considerados para relacionar obesidade e câncer: o eixo de insulina - IGF-1, hormônios sexuais e as citocinas derivadas de adipócitos (adipocinas) (PARK *et al.*, 2014). Por exemplo, alterações metabólicas no tecido adiposo de pessoas obesas levam a alterações metabólicas sistêmicas como resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia e inflamação crônica. Neste contexto, as células tumorais são capazes de invadir o estroma, e os adipócitos, por sua vez, circundam o microambiente tumoral, contribuindo desta forma para a progressão e desenvolvimento do tumor (BARLOW *et al.*, 2006).

Sendo assim, os mecanismos pelos quais a obesidade leva a um aumento na predisposição ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer estão sob intensa investigação.

1.1.2 Adipocinas

O tecido adiposo foi tradicionalmente considerado um órgão de armazenamento de energia de longo prazo. Atualmente, seu papel fundamental na integração do metabolismo sistêmico e na regulação de diversos processos patológicos é apreciado, sendo esta função metabólica mediada por sua capacidade de secretar variadas proteínas. Os adipócitos podem ser encontrados em associação com múltiplos órgãos, como por exemplo coração e rins, além de medula óssea e pulmões. Estudos demonstram que dietas de alto teor calórico podem promover o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório nestes depósitos de adipócitos de maneira semelhante ao observado no tecido adiposo subcutâneo e visceral (CHATTERJEE *et al.*, 2009). Vários produtos secretados pelo tecido adiposo foram bem caracterizados, sendo os fatores solúveis secretados por este tecido chamados de adipocinas (OUCHI *et al.*, 2003; BERG and SCHERER, 2005). O termo adipocina é utilizado para descrever certas citocinas produzidas pelo tecido adiposo, porém, é importante ressaltar que estas não são exclusivamente derivadas deste órgão. A expressão destes mediadores varia de acordo com o tipo de tecido adiposo corporal (Fig. 1.3). Por exemplo, os dois depósitos mais abundantes são os tecidos adiposos subcutâneo e visceral, que produzem perfis exclusivos de adipocinas (FRIED *et al.*, 1998; SAMARAS *et al.*, 2010). Adiponectina, leptina, resistina e visfatina são adipocinas que estabelecem hoje uma importante ligação entre obesidade, resistência à insulina e doenças inflamatórias. Outras citocinas como TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e agonista do receptor de IL-10 também são produzidas por adipócitos, sendo leptina e adiponectina as adipocinas produzidas de forma mais abundante (TILG and MOSCHEN, 2006).

Adipocina	Origem	Receptor	Função
Leptina	Adipócitos	Receptor de leptina	Controle do apetite através de ações no SNC
Resistina	Células mononucleares humanas e adipócitos (roedores)	Desconhecido	Promove resistência à insulina e inflamação através da secreção de IL-6 e TNF por macrófagos
RBP4	Fígado, adipócitos e macrófagos	Vitamina A	Ligada a resistência sistêmica à insulina
Lipocalina 2	Adipócitos e macrófagos	Desconhecido	Promove resistência a insulina e inflamação através da secreção de TNF por
ANGPTL2	Adipócitos e outras células	Desconhecido	Inflamação local e vascular
TNF	Células do estroma vascular e adipócitos	Receptor de TNF	Inflamação local e antagonismo da sinalização por insulina
IL-6	Fígado, músculo, adipócitos e células do estroma vascular	Receptor de IL-6	Varia com a origem e tecido-alvo
IL-18	Células do estroma vascular	Receptor de IL-18 e proteína ligante de IL-18	Inflamação de amplo espectro
CCL2	Adipócitos e células do estroma vascular	CCR2	Recrutamento de monócitos
CXCL5	Macrófagos	CXCR2	Antagonismo da via de insulina através de JAK-STAT
NAMPT	Adipócitos, macrófagos e outras células	Desconhecido	Quimioatraente de monócitos
Adiponectina	Adipócitos	Receptor de adiponectina 1 e 2, CD91, T-caderina	Sensibilidade a insulina, antiinflamatória
SFRP5	Adipócitos	WNT5a	Supressão da via de Wnt

Tabela 1.2 Origem e função das principais adipocinas. ANGPTL2: proteína 2 semelhante a angiopoietina; CCL2, CC: ligante de quimiocina 2; CXCL5, CXC: ligante de quimiocina 5; IL: Interleucina; JAK: Janus cinase; NAMPT: nicotinamida fosforibosiltransferase; RBP4: proteína 4 ligante de retinol; SFRP5: proteína 5 relacionada a frisado; STAT: Ativador da transcrição e transdutor de sinal; TNF: Fator de necrose tumoral. Adaptado de OUCHI *et al.*, 2011.

Adipsina (também conhecida como fator de complemento D) foi identificada como um adipocina em 1987 (COOK *et al.*, 1987). Em 1993, o fator de necrose tumoral (TNF) foi identificado como um produto pró-inflamatório produzido pelo tecido adiposo que é induzido em modelos de diabetes e obesidade, proporcionando desta maneira evidência para uma ligação funcional entre obesidade e inflamação (HOTAMILSLIGIL *et al.*, 1993). Posteriormente, em 1994, a leptina foi identificada como uma proteína específica secretada pelo tecido adiposo que regula a ingestão de alimentos e o gasto energético de maneira endócrina (ZHANG *et al.*, 1994). Da mesma forma, a identificação do inibidor de ativação do plasminogênio 1 (PAI1), que funciona como um inibidor da fibrinólise, é uma adipocina regulada positivamente em depósitos de tecido adiposo visceral em obesos, sugerindo desta forma uma importante relação entre obesidade e distúrbios trombóticos

(SHIMOMURA *et al.*, 1996). Também no ano de 1996, a adiponectina foi identificada como uma citocina específica de adipócitos. Na obesidade, esta possui sua expressão reduzida e estudos demonstram que esta adipocina protege contra várias doenças metabólicas e cardíacas associadas à obesidade (HU *et al.*, 1996; MAEDA *et al.*, 1996; SCHERER *et al.*, 1995) Estes resultados foram surpreendentes uma vez que a grande maioria das adipocinas estimulam a resposta inflamatória e são reguladas positivamente durante a obesidade. Desta forma, as adipocinas têm recebido uma grande atenção da comunidade científica por atuarem como reguladores da homeostase. Coletivamente, estas descobertas mostram que a disfunção metabólica relacionada ao excesso de tecido adiposo pode resultar em parte de um desequilíbrio na expressão de adipocinas pró e anti-inflamatórias, contribuindo para o desenvolvimento de complicações ligadas à obesidade. Na obesidade, a maioria dos níveis de adipocinas estão aumentados, sendo estas peças-chave na promoção de doenças metabólicas. Além das adipocinas já descritas como pró-inflamatórias, como leptina, TNF e IL-6, recentemente foram identificadas várias adipocinas que promovem inflamação de uma forma geral, são elas resistina, proteína de ligante de retinol 4 (RbP4), lipocalina 2, IL-18, CCL2, CXCL-5, dentre outras (Tab 2) (Revisado em OUCHI *et al.*, 2011).

1.1.2.1 Leptina

Há cerca de 20 anos, o gene Ob, que codifica a leptina, foi clonado (ZHANG *et al.*, 1994). A leptina foi identificada como um hormônio de 16 kDa produzido por adipócitos, produto do gene Ob, sendo sua taxa sanguínea proporcional ao conteúdo de tecido adiposo do corpo. Por exemplo, indivíduos saudáveis possuem uma taxa de 5 a 10 ng/mL deste hormônio no sangue, sendo que em pacientes obesos esta taxa aumenta para 40 a 100 ng/mL (VELLOSO *et al.*, 2008). Estas taxas indicam a ocorrência de resistência à leptina em indivíduos obesos, já que estes possuem altos níveis deste hormônio sem a resposta anoréxica esperada. Os níveis deste hormônio são proporcionais aos de insulina e inversamente proporcionais à concentração de glicocorticoides. Esta adipocina é sintetizada principalmente por adipócitos, porém, estudos têm demonstrado a produção de leptina em menor escala por outros tecidos, como placenta (MASUZAKI *et al.*, 1997), estômago (BADO *et al.*, 1998) e hipotálamo (MORASH *et al.*, 1999).

Desde a identificação da leptina, muitos avanços têm sido realizados na caracterização de mecanismos envolvidos nas disfunções hipotalâmicas que contribuem para o desenvolvimento da obesidade (HOWARD *et al.*, 2010). Esta adipocina realiza a

associação entre o tecido adiposo e o estado nutricional com a regulação neuroendócrina da homeostase energética. Isso ocorre principalmente através do aumento do gasto energético e da redução do apetite por seu papel no sistema nervoso central de mamíferos, onde regula a ingestão de alimentos (SCHWARTZ *et al.*, 2000). A leptina é transportada ativamente através da barreira hematoencefálica e atua no centro de saciedade hipotalâmico, reduzindo a ingesta alimentar e aumentando o gasto energético por inibir diretamente o neuropeptídeo Y (NPY) e aumentar os níveis de pró-ópiomelanocortina (DAS, 2010). Esta adipocina se liga aos seus receptores localizados ao longo do sistema nervoso central, bem como em vários tecidos periféricos.

O receptor de leptina é um membro da superfamília de receptores de citocinas classe I. Existem seis isoformas originadas por *splicing* alternativo (LepRa-f). O receptor LepRb possui o domínio citoplasmático mais longo (302 aminoácidos), sendo capaz de promover a transdução de sinal. Este é fortemente expresso em todo o sistema nervoso central, particularmente no hipotálamo, onde desempenha seu papel em regular a homeostase energética e função neuroendócrina (KELESIDIS *et al.*, 2010). Esta isoforma do receptor existe também em outros tipos celulares como leucócitos, adipócitos, osteoclastos, células endoteliais e epiteliais (HEGYI *et al.*, 2004). A ligação ao receptor longo LepRb ativa vias de sinalização que são responsáveis pelos efeitos centrais e periféricos da leptina (Fig. 1.4). As vias de sinalização ativadas por este hormônio a nível hipotalâmico incluem a Janus cinase 2 (JAK2)/ transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), fosfatase de tirosina citoplasmática homóloga a Src (SHP2)/ Proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/ Oncogene homólogo ao vírus de timoma murino (Akt)/ Alvo da rapamicina de mamífero (mTOR), proteína caixa 01 de forkhead O1 (FoxO1) e proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (Revisado por DALAMAGA *et al.*, 2013).

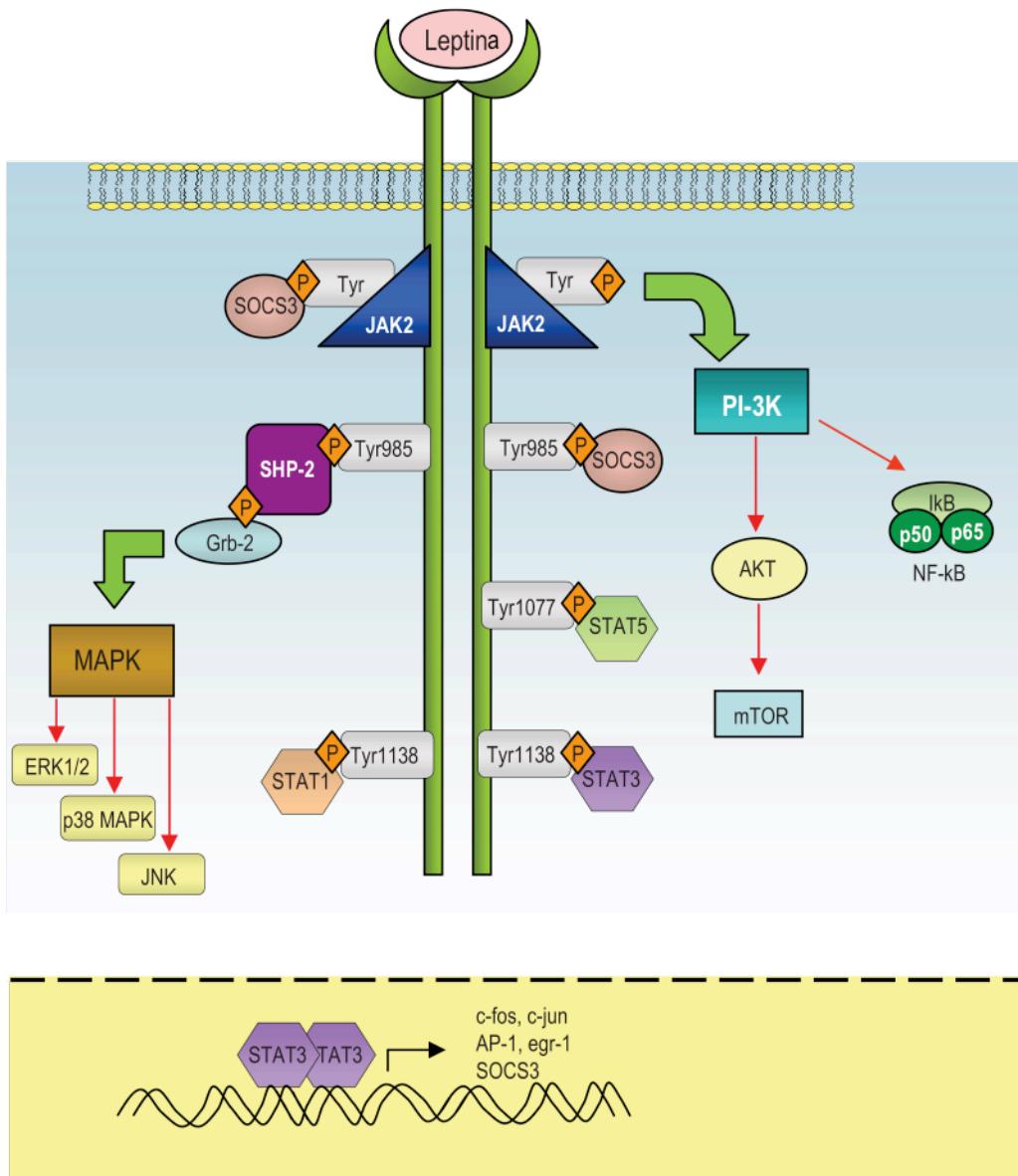


Figura 1.2 - Representação esquemática das vias de sinalização ativadas por leptina. Ligando ao seu receptor de forma longa (LepRb), Jak2 é ativada resultando na fosforilação de resíduos de tirosina. Por sua vez, Jak2 ativada leva a ativação da via de PI3K/Akt. Akt regula vários fatores como FOXO1 e NF-κB. STAT3 forma dímeros que translocam para o núcleo induzindo a expressão de genes como c-fos, c-jun, egr-1 e supressores da sinalização de citocina (SOCS3). SHP-2 ativa a via de ERK1/2, p38 MAPK e p42/44 MAPK através da interação com GRB2, induzindo a expressão de citocinas e quimiocinas. Adaptado de PROCACCINI *et al.*, 2013.

Muitos trabalhos discutem a questão da resistência à leptina na obesidade. De acordo com Zhang e Scarpace (2006), o evento de resistência à leptina está envolvido com receptores presentes em neurônios de primeira ordem, sendo que a ativação do sistema central de melanocortina previne esta resistência. Este estudo sugere ainda que a resistência à leptina envolve redução no número de receptores hipotalâmicos e transdução de sinal deficiente, além de defeitos tanto a nível de ativação do receptor,

como no receptor propriamente dito. Isso se atribui à redução do transporte de leptina para o sistema nervoso central associado com a dieta e obesidade (ZHANG e SCARPACE, 2006). Além disso, dados demonstraram que a resistência à leptina pode também ocorrer mediante desordens nos transportadores deste hormônio através da barreira hematoencefálica (ZIYLAN *et al.*, 2009). No entanto, durante a obesidade induzida por dieta, há uma resistência central desencadeada por defeitos nesta via de sinalização (METLAKUNTA *et al.*, 2008). Durante a obesidade, vários fatores contribuem para a resistência a leptina, por exemplo a hiperleptinemia em si, inflamação, estresse de retículo endoplasmático e defeito autofágico (ZHOU e RUI, 2013).

A leptina influencia a homeostase energética através de ações no sistema nervoso central e também possui ações parácrinas e autócrinas em tecidos que estocam triacilgliceróis, onde influenciam a degradação e síntese destes *in vitro*. Este hormônio modula também vários processos em órgãos periféricos como fertilidade, hematopoiese e resposta imune (HOWARD *et al.*, 2010). A leptina participa ainda de processos inflamatórios e de doenças envolvendo o sistema imune. Este hormônio é produzido em altos níveis durante condições inflamatórias e é capaz de modular a resposta imune inata e adaptativa (SANCHEZ-MARGALET *et al.*, 2003), promovendo a ativação de células T, monócitos e neutrófilos, além de induzir a produção de mediadores inflamatórios (LA CAVA e MATARESE, 2004). Este hormônio possui um papel bem estabelecido na modulação e regulação da imunidade inata. A leptina aumenta a atividade fagocítica (MANCUSO *et al.*, 2002) e secreção de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-12 em monócitos e macrófagos (LOFFREDA *et al.*, 1998; GAINSFORD *et al.*, 1996). Por outro lado, a leptina também exerce os seus efeitos na imunidade adaptativa. Ela modula a proliferação e produção de citocinas de células humanas T CD4+ naïve (CD45RA) e de memória (CD45RO). Em células T naïve a leptina promove proliferação e secreção de IL-2. Já em células T de memória, promove o bloqueio para o fenótipo T helper (Th1) através do aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α (PROCACCINI *et al.*, 2012). Leptina também promove a migração de células imunes para sítios inflamatórios através da indução de IFN- γ e expressão de moléculas de adesão, tais como ICAM-1 e CD49b, em células T CD4+.

Em estudos *ex vivo*, leptina promove a proliferação e a secreção de IL-2 por células T naïve, aumentando a atividade fagocítica de macrófagos, estimulando a proliferação e citotoxicidade de células NK e a quimiotaxia de polimorfonucleares, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-12

(CARBONE *et al.*, 2012). Papathanassoglou e colaboradores demonstraram *in vitro* que a leptina promove a sobrevivência dos linfócitos por suprimir a apoptose mediada por Fas (PAPATHANASSOGLOU *et al.*, 2006). Além disso, um estudo *in vivo* mostra que a administração de leptina melhora a disfunção imune de camundongos ob/ob e protege contra a disfunção imune em camundongos selvagens em jejum (HOWARD *et al.*, 1999). Em comparação com a população em geral, os indivíduos com deficiência de leptina congênita possuem uma maior incidência de infecções. Um estudo de Farooqi e colaboradores demonstrou que um paciente com deficiência de leptina foi relatado ter a função das células T CD4+ diminuída no início do estudo, e que estas se normalizaram após a administração de leptina exógena (FAROOQI *et al.*, 2002). Além disso, um aumento da proliferação de células T regulatórias (Treg) tem sido observada em camundongos deficientes em leptina (Ob/Ob) e deficientes no receptor de leptina (Db/Db). Foi recentemente mostrado que a leptina pode potenciar a ativação da via de mTOR, inibindo assim a proliferação induzida por rapamicina em Tregs (Revisado em PROCACCINI *et al.*, 2014). Nossa grupo demonstrou que a leptina também ativa a via de PI3K-mTOR em macrófagos. Neste trabalho, o tratamento com rapamicina, inibidor de mTOR, foi capaz de inibir o metabolismo lipídico e a produção de mediadores inflamatórios induzidos por esta adipocina (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008).

1.1.2.2 Leptina e câncer

Segundo estudos *in vitro*, a leptina pode originar uma neoplasia através da ativação de vias de sinalização de crescimento e sobrevivência, tais como JAK2/STAT3, PI3K/Akt e MAPK/ERK (GIBSON *et al.*, 2004), e também por aumento da resposta inflamatória e produção de citocinas (HWANG *et al.*, 2008). Além disso, o receptor de leptina (ObRb) é altamente relacionado à presença de leptina, sugerindo que a malignidade induzida por este hormônio deve ser regulada via mecanismos autócrinos e parácrinos (GAROFALO e SURMACZ, 2006; FIORIO *et al.*, 2008). Segundo o estudo de Riolfi e colaboradores, os níveis de leptina e de seu receptor (ObR) estão correlacionados com a malignidade de tumores de cérebro de uma forma geral (RIOLFI *et al.*, 2010). Além disso, de forma interessante, níveis elevados da expressão do receptor de leptina (LepR) foram encontrados em câncer colo-retal, endométrio (KODA *et al.*, 2007) e câncer de pulmão (RÉVILLION *et al.*, 2006). Um estudo de câncer epitelial de ovário em mulheres do Oriente Médio revelou que até 60% dos tumores apresentavam aumento da expressão do receptor de leptina, e que esta regulação correlaciona com a sobrevivência reduzida

(UDDIN *et al.*, 2009). Em uma linhagem de câncer de ovário (OVCAR3), demonstraram que a leptina inibe a apoptose e estimula a divisão celular através da inibição da p21 e aumento da expressão de ciclina D1 (CHEN *et al.*, 2013; PTAK *et al.*, 2013). Estes estudos demonstram um papel direto da leptina no crescimento e sobrevivência de células de câncer de ovário, porém, estudos *in vivo* são necessários para obter uma compreensão completa da relevância destes resultados para a clínica.

Em vários estudos a leptina também está relacionada ao desenvolvimento de tumor de mama. Um estudo de meta-análise mostrou que mulheres com câncer de mama com frequência exibem elevados níveis circulantes de leptina, o que sugere um papel para esta adipocina na progressão da doença (NIU *et al.*, 2013). Um outro estudo demonstra que pacientes com câncer de mama que apresentavam maiores níveis de RNA mensageiro para o receptor de leptina em seus tumores, concomitante com níveis elevados de leptina, obtiveram um pior prognóstico (MIYOSHI *et al.*, 2006). Estudo realizado em linhagens celulares de câncer da mama mostrou que a leptina induz o crescimento de células destas linhagens por meio de ativação das vias de JAK/STAT e PI3K (CIRILLO *et al.*, 2008). A leptina também potencia a migração e motilidade de células de tumor de mama (ANDÓ e CATALANO, 2011). Contribuições da leptina para o desenvolvimento de tumor mamário também foram avaliados em um modelo de roedor. Em um modelo específico, a restauração dos receptores funcionais de leptina em camundongos Db/Db normalizou seus ductos e melhorou seu fenótipo de obesidade. As células tumorais deficientes para o receptor de leptina também demonstravam maior capacidade de respiração mitocondrial e menor ativação de ERK e STAT3 (PARK *et al.*, 2010). Estudos também sugerem uma importante correlação entre o aumento da expressão de leptina e de seu receptor com o processo de carcinogênese, metástase e progressão do câncer de mama (XIA *et al.*, 2009). Coletivamente, estas observações demonstram que a sinalização do receptor de leptina tem um papel crucial na progressão do câncer de mama e que a inibição desta via pode proporcionar um potencial benefício terapêutico.

A leptina também participa dos mecanismos envolvidos na progressão do tumor de colôn. Apesar de alguns estudos relatarem níveis normais de leptina em pacientes com carcinoma colo-rectal (CRC) (WALLACE *et al.*, 1998; ARPACI *et al.*, 2002), alguns estudos caso-controle demonstraram um elevado risco de CRC associado com altos níveis de leptina no soro (STATTIN *et al.*, 2003; STATTIN *et al.*, 2004; TAMAKOSHI *et al.*, 2005). Além de aumentar o risco de CRC, os níveis de leptina no plasma e de seu receptor no

tecido têm sido associados a um fenótipo mais agressivo deste tipo de tumor (HEALY *et al.*, 2012; TUTINO *et al.*, 2011). Um estudo adicional de 108 pacientes chineses com CRC relatou uma associação significativa entre a leptina e a expressão de seu receptor com metástase ganglionar, diferenciação e aumento da expressão de PI3K/ Akt/ mTOR, sugerindo desta forma que a leptina pode regular a proliferação e apoptose deste tipo de tumor (WANG *et al.*, 2012).

Os estudos que avaliaram a expressão do receptor de leptina em amostras de tecido no CRC e na mucosa normal adjacente demonstraram maior expressão do receptor em cerca de 80 % das amostras. A expressão do receptor de leptina também se correlacionou com vários parâmetros clínico-patológicos, tais como diferenciação do tumor e presença de metástases (VAN DIELEN *et al.*, 2001; ALOULOU *et al.*, 2008; UDDIN *et al.*, 2009).

Já em estudos com linhagens celulares *in vitro*, a leptina inibe a apoptose em linhagens de câncer de cólon humano, promovendo a proliferação tanto de células epiteliais normais de cólon quanto de células tumorais (Revisado em BARDOU *et al.*, 2013). Na linhagem HCT-116, a leptina ativa a via PI3K-AKT, resultando em um aumento na proliferação e o tratamento com o inibidor de PI3K, LY294002, inibe a proliferação induzida por leptina. Já Ogunwobi e colaboradores demonstraram que esta adipocina induz a proliferação de células de tumor de cólon via JAK2/ STAT3. Em modelos *in vivo*, camundongos Ob/Ob são significativamente menos sensíveis à formação de pólipos induzidos por azoximetano comparados a animais selvagens, sugerindo um papel da leptina na iniciação do tumor de cólon. Além disso, uma comparação entre animais selvagens e deficientes em leptina (Ob/Ob) alimentados com uma dieta hiperlipídica (fortemente associada ao aumento da formação de pólipos) demonstrou que os animais deficientes em leptina foram protegidos da formação de pólipos em comparação com os selvagens (ENDO *et al.*, 2011).

A descoberta da leptina e as vias centrais envolvidas na homeostase energética contribuem para o desenvolvimento de mais intervenções farmacológicas para o tratamento da obesidade e suas complicações. Porém, os mecanismos e as vias de sinalização envolvidas na ativação celular por leptina ainda não são completamente conhecidos, necessitando de mais estudos para o estabelecimento de uma relação entre a obesidade e a formação de tumores.

1.1.3. mTOR

A mTOR (mamalian target of rapamycin) é uma serina/treonina cinase, pertencente à família das PI3K, importante na proliferação e metabolismo celular. Esta proteína foi descoberta no início dos anos 90, em estudos a respeito do mecanismo de ação do macrolídeo rapamicina, também conhecido como sirolimus, que possui efeitos imunossupressivos e anticâncer. Demonstrou-se que a rapamicina inibe a via de Akt em células endoteliais e suprime a angiogênese causada pela ativação constitutiva de Akt *in vivo* (SABATINI, 2006). A mTOR integra dois complexos multiprotéicos distintos: mTORC1 e mTORC2 (Fig. 1.5). O complexo mTORC1 é composto da proteína raptor, mLST8 (também conhecida como GbL), substrato de Akt rico em prolina de 40kDa (PRAS40), e proteína de interação da mTOR que contém o domínio DEP (Deptor). Este complexo integra vários sinais como fatores de crescimento, estado energético, oxigênio e aminoácidos, regulando desta forma processos envolvidos com o crescimento celular e metabolismo (Revisado por LAPLANTE e SABATINI, 2013). A regulação da atividade deste complexo é principalmente regulada pelo sensor TSC, um dímero composto por TSC1 e TSC2. O complexo da esclerose tuberosa (TSC) é um heterodímero de duas proteínas, hamartina (TSC1) e tuberina (TSC2), responsável por integrar sinais de estado energético, hipóxia e disponibilidade de nutrientes, em um sinal de crescimento para o complexo raptor-mTOR (GUERTIN e SABATINI, 2005). Quando ativo, o complexo mTORC1 fosforila o fator de regulação da tradução eucariótico 4E (eIF4E), proteína de ligação 1 (4E-BP1) e S6 cinase 1 (S6K1), que, por sua vez, promovem a síntese proteica (LAPLANTE e SABATINI, 2013). A atividade de mTORC1 em certos substratos é muito sensível ao macrolídeo rapamicina. Quando ligado à proteína de ligação a FK506 (FKBP12), a rapamicina interage e inibe a atividade cinase de mTORC1 (SABATINI *et al.*, 1994).

A rapamicina, também conhecida como sirolimus, é um protótipo inibidor de mTOR, que possui atividades imunossupressoras e anti-neoplásicas. Esta droga se liga a seu receptor intracelular, FKBP12, que por sua vez se liga diretamente ao complexo mTORC1, suprimindo a ativação de S6K e 4EBP1 (FAIVRE *et al.*, 2006). Este macrolídeo possui uma importante atividade anti-angiogênica, reduzindo a produção do fator de crescimento endotelial vascular e interrompendo desta forma o crescimento de células endoteliais vasculares. Com relação aos efeitos centrais, o complexo mTORC1 é importante para os efeitos da leptina no hipotálamo. Durante a redução energética, a AMPK inibe o complexo mTORC1, devido a fosforilação de TSC2 (INOKI *et al.*, 2003;

LUO *et al.*, 2005). A inibição do complexo mTORC1 por rapamicina, inibe o sinal anorexígeno da leptina, modulando a ingesta alimentar (COTA *et al.*, 2006).

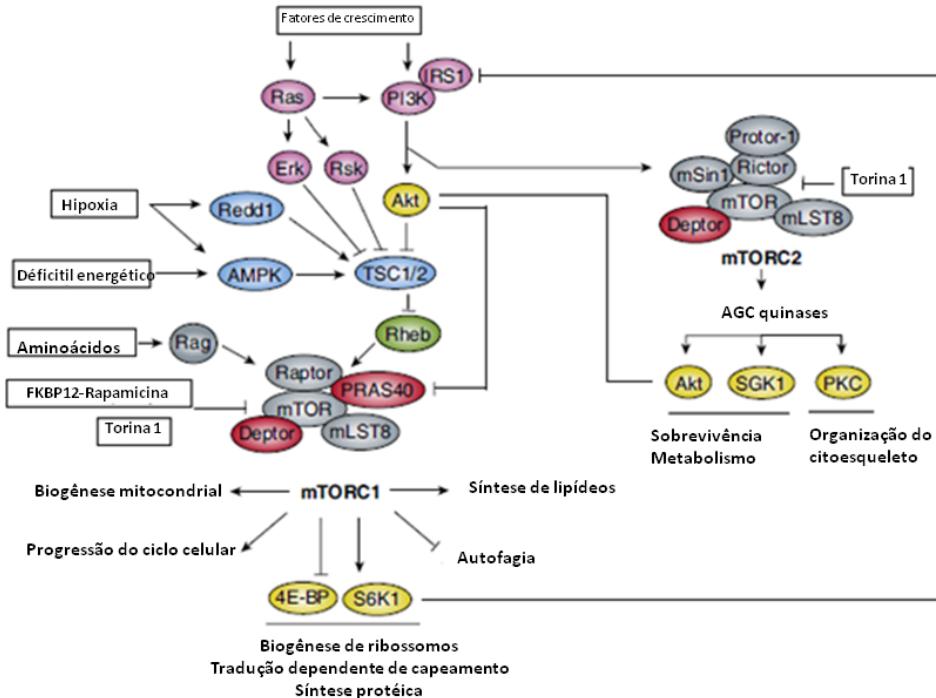


Figura 1.3 – Via de sinalização de mTOR. A mTOR integra dois complexos distintos: mTORC1 e mTORC2. mTORC1 é composto por cinco subunidades, enquanto mTORC2 possui seis proteínas. Um dos mais importantes sensores envolvidos no controle da atividade de mTORC1 é TSC. Um heterodímero formado por TSC1/2, que possui atividade GTPásica sobre Rheb. Fatores de crescimento ativam Akt, Erk e S6K, ativando o complexo mTORC1 através da ativação de Rheb e inativação de TSC. AGC cinases: Akt, SGK1, proteína cinase C (PKC). FKBP12: Receptor intracelular da rapamicina. Torina 1: inibidor de mTOR. Esquema adaptado a partir de SABATINI, 2009.

O complexo mTORC2 é composto por mTOR, proteína insensível a rapamicina anexa a mTOR (Rictor), proteína integradora de cinase ativada por estresse (mSin1), proteína anexa a Rictor-1 (Protor-1), mLST8 e deptor, sendo ativado por fatores de crescimento. mTORC2 regula assim o metabolismo celular, sobrevivência e organização de citoesqueleto (LAPLANTE e SABATINI, 2013). Comparado a mTORC1, se sabe menos sobre o complexo mTORC2. Ele é insensível a aminoácidos, mas responde a fatores de crescimento através de um mecanismo ainda não muito bem definido. Um potencial mecanismo sugere um papel dos ribossomos, já que estes são necessários para a ativação de mTORC2. mTORC2 se liga a lisossomos de maneira dependente de PI3K

(ZINZALLA *et al.*, 2011). Quando ativo, mTORC2 regula sobrevivência celular, metabolismo e organização do citoesqueleto através da fosforilação de vários membros da subfamília de cinases AGC (revisado por LAPLANTE e SABATINI, 2012). Devido a atividade do complexo mTORC2 não ser bloqueado pelo tratamento agudo com rapamicina, este complexo foi originalmente descrito como a complexo de mTOR insensível a rapamicina (SARBASSOV *et al.*, 2004). Esse modelo foi mais tarde desafiado por estudos que demostram que tratamento crônico com rapamicina modifica a integridade e o efeito de mTORC2 em alguns tipos de células (SARBASSOV *et al.*, 2006).

As células em crescimento requerem uma quantidade substancial de lipídios para apoiar biossíntese de membranas. Desta forma, além de regular a síntese proteica, mTORC1 também controla a síntese de lipídios necessários para a proliferação de células originando novas membranas (revisado em LAPLANTE e SABATINI, 2009). De forma importante, mTORC1 atua através dos fatores de transcrição (SREBP1/2), que por sua vez controlam a expressão de numerosos genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e de colesterol (LAPLANTE e SABATINI, 2012). O complexo mTORC1 também desempenha um importante papel na adipogênese, processo que leva à formação de tecido adiposo, o mais importante sítio de armazenamento de energia em mamíferos. *In vitro*, a inibição de mTORC1 bloqueia a adipogênese e dificulta a manutenção de adipócitos. Já a superativação de mTORC1 promove a adipogênese (ZHANG *et al.*, 2009). Corroborando estes resultados, Kershaw e Flier (2004) observaram que o complexo mTORC1 é altamente ativo no tecido adiposo de roedores obesos. Sugerindo assim, a participação de mTOR no acúmulo de lipídeos quando o gasto energético é menor que a ingestão alimentar (KERSHAW e FLIER, 2004). Muitos dos efetores de mTORC1 também estão envolvidos no controle da adipogênese. S6K1, por exemplo, regula a transição de células-tronco embrionárias para progenitores adipogênicos através da regulação da expressão de fatores de transcrição adipogênicos. Já as 4E-BPs controlam a diferenciação terminal de adipócitos através do controle de tradução do principal regulador da adipogênese, o PPAR γ . Em suma, através da fosforilação de várias outras proteínas efetoras, o complexo mTORC1 promove a biogênese de lipídios, controla o metabolismo e suprime autofagia (revisado por LAPLANTE e SABATINI, 2009). Embora tenha sido inicialmente assumido que o complexo mTORC2 também desempenha papel na adipogênese, estudos iniciais utilizando animais deficientes para Rictor, mostraram que estes animais não exibiam alterações na adipogênese. No entanto, Yao e colaboradores descobriram recentemente um papel para mTORC2 em adipogênese (YAO

et al., 2013). Eles demonstraram que a fosforilação de Akt por mTORC2 é dependente da interação de Akt com BTSA (Proteína contendo domínio BSD) fosforilada. Além disso, foi mostrado que BSTA é um substrato direto de mTORC2, e a fosforilação de BSTA promove a interação com Akt. Células-tronco embrionárias deficientes para BSTA tem defeito na fosforilação de Akt e não são capazes de se diferenciar em adipócitos. Estes estudos sugerem que mTORC2 é essencial para o início da adipogênese, mas não afeta este evento em adipócitos maduros (Revisado em LAMMING e SABATINI, 2013).

O aumento na lipogênese é um marcador de células cancerígenas em proliferação. Como mTORC1 está muitas vezes superativado em vários tipos de câncer, estudos vêm demonstrando um importante papel deste na condução da tumorigênese, promovendo a síntese de lipídeos através da ativação de SREBPs (LAPLANTE e SABATINI, 2013). O complexo mTORC1 indiretamente aumenta a expressão da enzima ácido graxo sintase (FAS), um alvo de SREBP1 envolvido na biogênese de lipídeos que favorece a exacerbada proliferação de células tumorais (ZONCU *et al.*, 2011). O grupo de Manning (2010) relatou recentemente que a depleção de SREBPs bloqueia a proliferação de células que possuem o complexo mTORC1 constitutivamente ativo (DUVEL *et al.*, 2010). O eixo mTORC1-SREBPs pode também desempenhar um papel no desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma condição que é caracterizada por acúmulo excessivo de lipídios no fígado, podendooccasionar cirrose e câncer hepático. A maior evidência de que mTOR pode ocasionar tumorigênese vem de síndromes familiares ligadas a mutações nos reguladores negativos de mTOR, como TSC1-TCS2, LKB1 e PTEN (proteína homóloga fosfatase/tensina). Além disso, dados epidemiológicos indicam que a mutação esporádica ou desregulação de PI3K, Akt e PTEN estão, juntamente com p53, entre as alterações mais prevalentes em cânceres humanos (YUAN e CANTLEY, 2008). 4E-BP1 está emergindo como um regulador chave da proliferação celular, sendo que sua inativação pode contribuir diretamente para o crescimento de cânceres esporádicos. Um estudo com fibroblastos embrionários murinos (MEFs) deficientes para 4E-BP1 e 4E-BP2 mostrou um aumento da proliferação, mas não do tamanho destas células, indicando que a inibição da 4E-BP por mTORC1 impulsiona a progressão do ciclo celular, mas não o crescimento celular (DOWLING *et al.*, 2010). Já eIF4E ativado conduz preferencialmente a tradução de RNA mensageiros para os genes pró-tumorigênicos, incluindo reguladores do ciclo celular. Finalmente, a mTOR está envolvida em diversos eventos celulares, além de possuir uma importante participação na tumorigênese. Sendo assim, atualmente o complexo mTORC1 é um alvo atrativo para a

supressão de tumores. A leptina ativa este complexo no hipotálamo e também em macrófagos, porém, ainda não se sabe muito sobre os efeitos deste hormônio na sinalização periférica, sendo necessários mais estudos para investigar a ação desta adipocina em patologias como a obesidade e o câncer.

1.1.4. Obesidade, metabolismo lipídico e câncer

Tanto a prevalência, quanto a incidência de obesidade e doenças relacionadas à obesidade, têm aumentado de forma dramática com o passar das décadas (LANG e RATKE, 2009). Na obesidade há um estado crônico de inflamação leve, caracterizado por uma produção anormal de citocinas e ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias (GAROFALO e SURMACZ, 2006). A inflamação presente no tecido adiposo durante esta patologia influencia outros sistemas através de uma comunicação direta por exemplo com o fígado, secreção de adipocinas, toxicidade celular mediada por lipídios e ativação do sistema imune inato (O'ROURKE, 2009). Estudos têm revelado uma importante relação entre as adipocinas e o metabolismo lipídico, exercendo estas efeitos sob o estoque e mobilização de ácidos graxos, eventos estes críticos para patologias relacionadas à obesidade (LAGO *et al.*, 2009). Além disso, um estudo extenso de Calle e colaboradores demonstrou que o aumento no peso corporal esteve associado a 57.000 mortes por câncer em um número total de 900.000 homens e mulheres que não possuíam a doença no início do estudo (CALLE *et al.*, 2003). Vários estudos têm demonstrado que o acúmulo crônico de lipídios está associado ao desenvolvimento tumoral (HASHMI *et al.*, 2015). Por exemplo, o gene de p53 é responsável por mudanças metabólicas através da regulação do metabolismo energético e estresse oxidativo. Uma contínua proliferação descontrolada, diferenciação e sobrevivência celular levam ao câncer. As células tumorais são capazes de ajustar seu próprio metabolismo através da síntese "de novo" de lipídios e estes lipídios regulam importantes vias de sinalização como PI3K/Akt, Ras ou Wnt.

O aumento da lipogênese e defeitos na regulação de lipídios são fenótipos comuns em diversas patologias, e muitos trabalhos tem associado o aumento no número de corpúsculos lipídicos a doenças extremamente difundidas e de grande relevância econômica, como diabetes, aterosclerose, processos inflamatórios e neoplasias. Entretanto, apesar dos indícios de que corpúsculos lipídicos desempenham um importante papel no estabelecimento destas diferentes patologias, os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não foram completamente elucidados. Portanto, é de

grande interesse entender os mecanismos regulatórios envolvendo corpúsculos lipídicos para a identificação de possíveis novos alvos terapêuticos.

1.1.4.1 Corpúsculos lipídicos

Em diferentes sistemas celulares, incluindo macrófagos, adipócitos, células epiteliais, dentre outros, lipídeos intracelulares são estocados e metabolizados em organelas hidrofóbicas denominadas corpúsculos lipídicos (BOZZA *et al.*, 2007). Corpúsculos lipídicos são organelas heterogêneas em relação ao tamanho e composição, e referidas por diferentes termos na literatura como “gotas lipídicas”, “corpúsculos lipídicos”, “glóbulos lipídicos” ou “adipossomos” (MURPHY, 2001; MARTIN e PARTON, 2006). Tratam-se de inclusões citoplasmáticas esféricas de compartmentalização e estocagem de lipídios, não delimitadas por membrana clássica, mas sim, por uma monocamada de fosfolipídeos, associadas a elementos do citoesqueleto. Em estudos de ultra-estrutura apresentam elétron-densidade variável (DVORAK AND MONAHAN-EARLY, 1992; DVORAK *et al.*, 1992; FRANKE *et al.*, 1987). São descritos como uma das duas maiores formas de composição macromoleculares de lipídeos em sistemas biológicos, a outra sendo as bicamadas lipídicas que formam a matriz de todas as membranas celulares (MURPHY, 2001).

Há alguns anos, acreditava-se que corpúsculos lipídicos eram estruturas exclusivamente presentes em tecidos que exercem um papel no acúmulo ou transporte de lipídios em animais e plantas, como no tecido adiposo e no fígado em mamíferos, ou em frutas e sementes de plantas (MURPHY, 2001). Já em diversos procariotos e organismos como leveduras, o acúmulo de corpúsculos lipídicos era observado em resposta a estresse ambiental, como por exemplo, limitação de nitrogênio ou estresse osmótico (MURPHY, 2001; WÄLTERMANN e STEINBÜCHEL, 2005). Os corpúsculos lipídicos eram descritos como sítios de estocagem, e metabolicamente inativos em termos de funções celulares. Contudo, a partir do advento de novas técnicas de análise, os corpúsculos lipídicos foram localizados em praticamente todos os tipos celulares (MURPHY, 2001; MARTIN e PARTON, 2006). Estas organelas foram consideradas por muito tempo depósitos inertes de gordura, mas hoje se sabe que estas são organelas dinâmicas envolvidas no metabolismo e tráfego lipídico, produção de mediadores inflamatórios, tráfego de membranas e vias de sinalização intracelular (BOZZA e VIOLA, 2010).

1.1.4.1. Estrutura e morfologia

Os corpúsculos lipídicos são compostos por uma monocamada de fosfolipídios anfipáticos, glicolipídios e esteróides que circundam um núcleo hidrofóbico composto por lipídios neutros, como triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis, ésteres de colesterol, ésteres de retinil e colesterol livre (ZWEYTICK *et al.*, 2000; MURPHY, 2001; TAUCHI-SATO *et al.*, 2002; MARTIN e PARTON, 2005). Dependendo do tipo celular, a quantidade e proporção de lipídios neutros presentes no núcleo dessas organelas varia. Os fosfolipídios presentes na superfície de corpúsculos lipídicos são estruturalmente diferentes dos fosfolipídios presentes nas membranas do retículo endoplasmático rugoso, ou dos microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios (TAUCHI-SATO *et al.*, 2002), sendo a fosfatidilcolina o principal fosfolipídio encontrado na monocamada que circunda corpúsculos lipídicos (TAUCHI-SATO *et al.*, 2002; BARTZ *et al.*, 2007).

Os corpúsculos lipídicos se apresentam como estruturas constituídas de um núcleo de material amórfico, com elétron-densidade variável, circundados por uma linha eletro densa medindo de 2-2,5 nm de espessura (DVORAK, 1991; TAUICHI-SATO *et al.*, 2002). Estes podem ser visualizados utilizando marcação com tetróxido de ósmio (WELLER *et al.*, 1991; BOZZA *et al.*, 1996b), com sondas fluorescentes hidrofóbicas como por exemplo o Nile red (GREENSPAN *et al.*, 1985), ou com lipídios conjugados a sondas fluorescentes, como Bodipy (DIDONATO e BRASAEMLE, 2003). Estas organelas sofrem variações importantes em seu tamanho, havendo organelas recém-formadas medindo 50 nm de diâmetro até organelas de 200 µm encontradas em adipócitos maduros, por exemplo. Em algumas condições como infecções, inflamação ou neoplasias, estes podem sofrer variação em seu número e dimensão (WELLER *et al.*, 1989; PACHECO *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2003; D'AVILA *et al.*, 2006; MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008; ACCIOLY *et al.*, 2008).

Várias funções descritas para corpúsculos lipídicos estão relacionadas à sua composição proteica, que compreende enzimas de metabolismo e transporte de ácidos graxos, enzimas envolvidas na formação de mediadores inflamatórios (BOZZA *et al.*, 2007), citocinas, proteínas da família Rab (LIU *et al.*, 2004) e proteínas cinases (YU *et al.*, 1998; YU *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2002). Também estão descritas proteínas estruturais envolvidas na biogênese e mobilização dessas organelas (BRASAEMLE, 2007; BICKEL *et al.*, 2009), estruturas ribossomais e proteínas associadas ao RNA (DVORAK *et al.*, 2003; WAN *et al.*, 2007).

As associações de corpúsculos lipídicos com estruturas citoplasmáticas mais bem documentadas são com cisternas do retículo endoplasmático, que são vistas com frequência envolvendo corpúsculos lipídicos (BOZZA *et al.*, 1997; MARTIN e PARTON, 2005; OZEKI *et al.*, 2005). Foi observada a interação entre corpúsculos lipídicos e mitocôndrias em monócitos e em células epiteliais de intestino (WAN *et al.*, 2007; ACCIOLY *et al.*, 2008). Além disso, foi vista a associação de corpúsculos lipídicos com peroxissomos em células da linhagem COS-7 (SCHRADER, 2001), enquanto que Binns e colaboradores mostraram que esta interação em leveduras promove o acoplamento da lipólise nos corpúsculos lipídicos com a β -oxidação de ácidos graxos em peroxissomos (BINNS *et al.*, 2006). Corpúsculos lipídicos também estão associados à membrana perinuclear em leucócitos e células epiteliais de cólon (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001a; ACCIOLY *et al.*, 2008). Além disso, corpúsculos lipídicos podem interagir com o citoesqueleto, tanto com filamentos intermediários como vimentina quanto com microtúbulos (FRANKE *et al.*, 1987; POL *et al.*, 2004; BOSTRÖM *et al.*, 2005). Por fim, pode ocorrer relocação de corpúsculos lipídicos em leucócitos fagocíticos em resposta a infecções, onde é possível observar interação dessas organelas com fagossomos (MELO *et al.*, 2003; VAN MANEN *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2006; D'AVILA *et al.*, 2006).

1.1.4.2. Biogênese de corpúsculos lipídicos

Apesar da composição e morfologia dos corpúsculos lipídicos serem bastante conhecidas, o mecanismo de formação destes ainda não foi totalmente esclarecido. Modelos hipotéticos foram propostos para explicar a biogênese destas organelas, sendo que estes compartilham a idéia de que estas organelas são originadas no retículo endoplasmático e estão intimamente relacionadas com o mesmo (MARTIN e PARTON, 2006; BOZZA *et al.*, 2009). Estes modelos baseiam-se na transferência de lipídios e proteínas do retículo endoplasmático para corpúsculos lipídicos em formação, e algumas evidências suportam esta idéia (Fig. 1.4). Nesse sentido, conforme discutido acima, associação mais bem documentada é com cisternas do retículo endoplasmático.

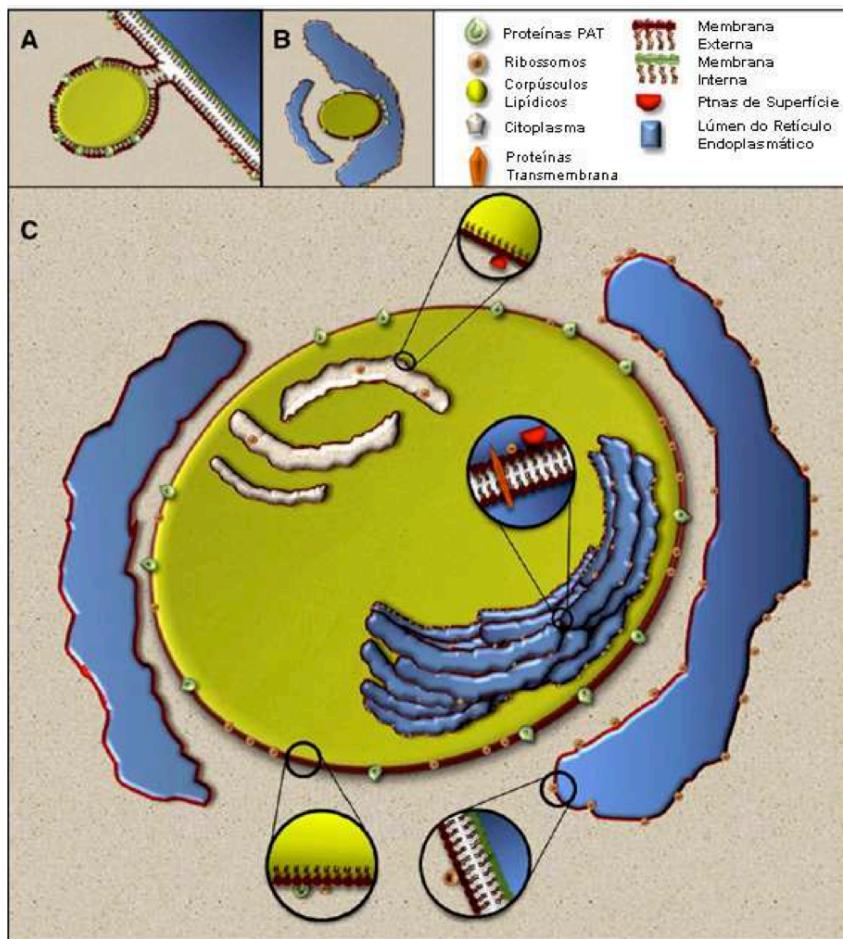


Figura 1.4. Biogênese e estrutura de corpúsculos lipídicos. Três modelos de biogênese de corpúsculos lipídicos estão mostrados: (A) formação de massa de lipídios neutros, sintetizada por enzimas e depositada entre as duas camadas da membrana do retículo endoplasmático, seguido pelo brotamento da estrutura lipídica para o citoplasma; (B) formação de corpúsculos lipídicos em domínios do retículo endoplasmático em forma de cálice e ricos em proteínas PAT, uma família de proteínas estruturais de corpúsculos lipídicos; (C) formação de corpúsculos lipídicos por incorporação de domínios membranosos do retículo endoplasmático, contendo proteínas de superfície, proteínas transmembrana e ribossomos em seu interior (no detalhe). Adaptado de BOZZA et al., 2009.

Atualmente existem três principais modelos utilizados para explicar como ocorre a biogênese de corpúsculos lipídicos. Um dos primeiros modelos sugere que corpúsculos lipídicos derivam de um “brotamento” da membrana do retículo endoplasmático, o que explicaria sua organização em um núcleo de lipídios neutros rodeados por uma monocamada de fosfolipídios (MURPHY *et al.*, 2001; TAUCHI- SATO *et al.*, 2002; MARTIN e PARTON, 2006) (Figura 1.4.A). Lipídios neutros seriam sintetizados a partir de colesterolíis livres e ácidos graxos (CHANG *et al.*, 2006; TURKISH e STURLEY, 2007). O depósito desses lipídios previamente sintetizados seria feito entre as duas camadas da membrana do retículo. Após atingir um determinado nível esses brotariam em direção ao citoplasma, levando consigo uma parte do folheto citoplasmático da membrana do

retículo, que se organiza como uma monocamada de fosfolipídios, delimitando o corpúsculo lipídico recém-formado.

Um modelo alternativo de biogênese foi baseado em resultados obtidos por microscopia de criofratura, no qual estruturas membranares consistentes com a membrana do retículo endoplasmático foram observadas em contato próximo com estruturas identificadas como corpúsculos lipídicos (Figura 1.4.B). Há uma teoria de que a biogênese dessas organelas ocorre próximo ao retículo, em regiões compartimentalizadas em formato de cálice, onde haveria o transporte e depósito de lipídios mediado por proteínas estruturais de corpúsculos lipídicos (ROBENEK *et al.*, 2006). Além disso, Wan e colaboradores mostraram por microscopia eletrônica a presença de domínios de membrana e ribossomos incorporados ao núcleo lipídico dessas organelas (WAN *et al.*, 2007) (Figura 1.4.C). Estes autores sugerem um modelo de biogêneses que implica na incorporação estruturas de membranas lamelares derivados do retículo endoplasmático no interior de corpúsculos lipídicos (WAN *et al.*, 2007; BOZZA *et al.*, 2009). De acordo com este modelo, corpúsculos lipídicos poderiam incorporar e acomodar proteínas transmembrana não somente na periferia dessas organelas, mas também em seu interior, como são comumente detectadas (DVORAK *et al.*, 1993; BOZZA *et al.*, 1997; BOZZA *et al.*, 1998).

Dentre as evidências que suportam a origem reticular destas organelas está a observação de que proteínas residentes em retículo endoplasmático foram encontradas em purificados de corpúsculos lipídicos (BRASAEMLE *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; UMLAUF *et al.*, 2004). Pol e colaboradores utilizaram uma versão mutada e fluorescente da proteína caveolina (cav3DGF-YFP) para avaliar a formação de corpúsculos lipídicos em tempo real. Em células mantidas em privação de soro, onde não houve presença detectável dessas organelas, a proteína cav3DGF-YFP acumulou-se exclusivamente no retículo endoplasmático. Com a adição de ácido oleico, foi observada a rápida formação de novos corpúsculos lipídicos contendo a proteína cav3DGF-YFP incorporada (POL *et al.*, 2004). Outro estudo conduzido por Gubern e colaboradores mostrou que a enzima fosfolipase A_{2α} citosólica (cPLA2-α) é fundamental para biogênese de corpúsculos lipídicos (GUBERN *et al.*, 2008).

A biogênese de corpúsculos lipídicos é um processo induzido, altamente regulado, e depende de estímulos específicos em cada tipo celular. Na presença de proteínas como interleucinas e quimiocinas, leucócitos rapidamente formam corpúsculos lipídicos mesmo na ausência de lipídios exógenos (BOZZA *et al.*, 1998; BARTEMES *et al.*, 1999;

BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001b, 2002b, PACHECO *et al.*, 2007). Em neutrófilos, corpúsculos lipídicos são induzidos *in vitro* após estímulo com fator ativador de plaquetas (PAF), ativadores da proteína cinase C (PKC) ou ácidos graxos *cis*-insaturados como ácido oleico ou ácido araquidônico (WELLER *et al.*, 1989, 1991b; BOZZA *et al.*, 1996a, 1996b). O aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos em neutrófilos e macrófagos também foi observado após indução de inflamação por lipopolissacarídeos (LPS) ou lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL), mas não por LDL nativa (PACHECO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Recentemente foi descrito por nosso grupo a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos após estímulo por leptina, mostrando um papel fundamental das proteínas fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e mTOR na biogênese dessas organelas (MAYA- MONTEIRO *et al.*, 2008). Em leucócitos, por exemplo, PAF induz a formação de corpúsculos lipídicos via PKC e ativação da fosfolipase C (PLC) (BOZZA *et al.*, 1996a, 1997, 1998). Além disso, quimiocinas atuando via receptores CCR3 como RANTES e eotaxina podem iniciar este processo por ativação de proteínas mitogênicas como MAP cinases, PI3K e tirosina-cinases em eosinófilos e basófilos (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001b; VIEIRA-DE-ABREU *et al.*, 2005). A prostaglandina D2 (PGD2) é capaz de induzir diretamente a biogênese de corpúsculos lipídicos em eosinófilos (MESQUITA-SANTOS *et al.*, 2006).

Em células epiteliais, foi observada a biogênese de corpúsculos lipídicos após tratamento com ácidos graxos insaturados, envolvendo atividade de PI3K e p38 cinase (MOREIRA *et al.*, 2009). Foi demonstrada a importância de fosfolipase D1 e de ERK2 na formação de corpúsculos lipídicos tanto em fibroblastos quanto em sistema livre de células (ANDERSSON *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou um papel crucial da proteína P311 na indução de corpúsculos lipídicos por ácido retinóico em fibroblastos pulmonares (LEUNG *et al.*, 2008). Já Gubern e colaboradores mostraram que a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por soro depende de fosforilação da enzima cPLA2- α no resíduo Ser505 em diversos tipos celulares, sugerindo um papel central desta enzima neste processo (GUBERN *et al.*, 2008). Mais recentemente, o mesmo grupo mostrou que as proteínas JNK e ceramida cinase são responsáveis pela fosforilação de cPLA2- α requerida para a síntese de corpúsculos lipídicos (GUBERN *et al.*, 2009). As proteínas Prp19p e FSP27 (proteína específica de gordura 27) foram identificadas como constituintes de corpúsculos lipídicos e necessárias para sua biogênese em adipócitos de camundongos (CHO *et al.*, 2007; PURI *et al.*, 2007; NISHINO *et al.*, 2008). Um homólogo de seipina, proteína envolvida na Lipodistrofia Congênita de Berardinelli-Seip (BSCL),

também é importante na biogênese e manutenção de corpúsculos lipídicos em leveduras (SZYMANSKI *et al.*, 2007; FEI *et al.*, 2008). Já em células endoteliais foi observada a formação de corpúsculos lipídicos durante hipóxia, mediada por PKC e sinalização dependente de tirosinas cinases (SCARFO *et al.*, 2000).

1.1.4.3. Composição e possíveis funções de corpúsculos lipídicos

As várias funções desempenhadas por corpúsculos lipídicos estão diretamente relacionadas à sua composição lipídica e proteica, embora elas ainda não tenham sido completamente esclarecidas. Já está bem caracterizado que corpúsculos lipídicos estão envolvidos na síntese de eicosanóides durante inflamações. Corpúsculos lipídicos foram descritos como sítios ricos em ácido araquidônico (AA) (WELLER e DVORAK, 1985). É possível verificar correlações entre a biogênese de corpúsculos lipídicos e a geração de eicosanoides como prostaglandina E₂ (PGE₂) e leucotrieno B4 (LTB₄), gerados por ciclooxygenase (COX) e lipoxigenase (LO), respectivamente (BOZZA *et al.*, 1996a, 1996b, 1997; PACHECO *et al.*, 2002, 2007). Como descrito anteriormente, foi demonstrado também nessas organelas a compartimentalização de enzimas fundamentais na liberação de AA, como cPLA₂, ERK1, ERK2, p38 e p85 (YU *et al.*, 1998), assim como as principais enzimas envolvidas na sua conversão em eicosanoides, como 5-LO, 15-LO e COX (BOZZA *et al.*, 1997, 1998; DVORAK *et al.*, 1992, 1993), ou leucotrienos, como LTC4 sintase (BOZZA *et al.*, 1998). Por fim, através de imobilização de eicosanóides recém-formados *in situ*, foi possível comprovar que corpúsculos lipídicos são sítios intracelulares de produção de LTC4, LTB4 e PGE₂ em leucócitos estimulados (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001b, 2002a; VIEIRA-DE-ABREU *et al.*, 2005; D'AVILA *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2007). Esses dados apontam para um importante papel desempenhado por essas organelas no estabelecimento de um ambiente inflamatório (BOZZA *et al.*, 2009; BOZZA e VIOLA, 2010). Enzimas formadoras de eicosanoides também foram encontradas em células não-mieloides, implicando a importância de corpúsculos lipídicos na produção dessas moléculas também em condições não inflamatórias (DVORAK *et al.*, 1992, 1993, 1994; AREND *et al.*, 2004; ACKERMAN *et al.*, 2005; XIE *et al.*, 2006).

Análises de proteômica identificaram inúmeras proteínas GTPases da família Rab (BRASAEMLE *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; UMLAUF *et al.*, 2004; OZEKI *et al.*, 2005). A localização de uma dessas proteínas, Rab18, foi posteriormente confirmada por imunofluorescência em diferentes tipos celulares (MARTIN *et al.*, 2005; OZEKI *et al.*, 2005). Proteínas Rab são reguladoras críticas do tráfego vesicular e de interações entre

organelas (SEABRA *et al.*, 2002), e a presença dessas proteínas em corpúsculos lipídicos sugere interação com outras organelas na célula (LIU e col., 2007). Por exemplo, Ozeki e colaboradores mostraram que Rab18 medeia interações entre corpúsculos lipídicos e o retículo endoplasmático (OZEKI *et al.*, 2005). A presença de proteínas Rab em corpúsculos lipídicos ainda sugere um papel dessas organelas no tráfego de membranas (LIU *et al.*, 2004; MURPHY *et al.*, 2009).

A presença de diversas proteínas cinases em corpúsculos lipídicos indica que esta organela possa atuar como um domínio citoplasmático implicado na compartimentalização da sinalização intracelular. Foi demonstrada a localização em corpúsculos lipídicos de proteínas MAP cinases, PKC e PI3K, enzimas chave na sinalização intracelular lipídica em diversas respostas celulares (YU *et al.*, 1998, 2000; CHEN *et al.*, 2002). A fosfolipase cPLA2, enzima que especificamente hidrolisa ácido araquidônico de glicofosfolipídios (CLARK *et al.*, 1990; LESLIE, 1991) é ativada por fosforilação pelas proteínas MAP cinase ERK1, ERK2 e p38 (LIN *et al.*, 1993; SA *et al.*, 1995). Yu e colaboradores mostraram a co-localização dessas cinases com cPLA2 em corpúsculos lipídicos ricos em araquidonato (YU *et al.*, 1998), sugerindo que a compartimentalização da sinalização garante a rápida ativação de cPLA2 em resposta a estímulos extracelulares.

Outro grupo de proteínas que podem ser encontradas em corpúsculos lipídicos são citocinas, uma família de glicoproteínas envolvidas em crescimento celular, inflamação, imunidade, diferenciação e reparo. Essas moléculas sinalizadoras são produzidas por diversas células, incluindo leucócitos ativados como macrófagos, neutrófilos, mastócitos basófilos e eosinófilos. Essas células são capazes de estocar citocinas em diversos compartimentos celulares, como grânulos, vesículas e corpúsculos lipídicos (BANDEIRAMELO e WELLER, 2005). A primeira citocina encontrada nessas organelas foi o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), localizado em corpúsculos lipídicos de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos infiltrantes de amostras de tecido intersticial de pacientes com doença de Crohn (BEIL *et al.*, 1995). TNF- α também foi localizado em corpúsculos lipídicos de leucócitos circulantes de pacientes com quadro clínico de sepse e de camundongos após indução de sepse experimental (PACHECO *et al.*, 2002). Da mesma forma, o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) foi localizado em corpúsculos lipídicos de mastócitos pulmonares (DVORAK *et al.*, 2001), e os fatores táticos IL-16 e RANTES foram detectados em corpúsculos lipídicos de eosinófilos (LIM *et al.*, 1996). É possível ainda que corpúsculos lipídicos participem de processos de exocitose de citocinas. Foi demonstrado recentemente que proteínas SNARE medeiam a fusão entre

corpúsculos lipídicos (BOSTRÖM *et al.*, 2007). Já que essas proteínas são importantes para a fusão de vesículas secretórias e a membrana plasmática (HONG *et al.*, 2005; JAHN e SCHELLER, 2006), é possível que estas organelas também participem desse processo. No entanto, a sua participação na exocitose ainda não foi demonstrada.

1.1.4.4. Regulação de corpúsculos lipídicos no câncer

A lipogênese tem sido associada com alguns carcinomas humanos, tendo sido identificada como determinante de mau prognóstico em câncer de mama, próstata e cólon (KUHAJDA, 2006; SWINNEN *et al.*, 2006). A observação de que algumas células neoplásicas exibem números aumentados dessas organelas revelou a possibilidade de utilizar a detecção de corpúsculos lipídicos ou a quantificação de proteínas da família PAT como biomarcadores de alguns tipos de câncer. Por exemplo, Straub e colaboradores mostraram que proteínas PAT são frequentemente encontradas em tecidos neoplásicos que apresentam algum grau de esteatose, como no carcinoma hepático, no carcinoma colorretal, e no carcinoma de células renais, porém com níveis diferentes de expressão (STRAUB *et al.*, 2010). É particularmente interessante a relevância que a proteína ADRP vem adquirindo como possível biomarcador, suportado pela sua expressão diferencial em alguns tipos de câncer. Foi observado o aumento da expressão de ADRP em carcinoma de células renais (RAE *et al.*, 2000; YAO *et al.*, 2005, 2007), no carcinoma hepatocelular (KUROKAWA *et al.*, 2004), em algumas lesões cutâneas malignas e pré-malignas (OSTLER *et al.*, 2010), em carcinoma de cólon (MATSUBARA *et al.*, 2011) e no carcinoma apócrino de mama (MORITANI *et al.*, 2011).

Apesar da possível ligação da lipogênese com câncer, existem ainda poucas evidências sobre os mecanismos que regulam a biogênese de corpúsculos lipídicos ou a sua significância funcional na tumorigênese. No entanto, observações do nosso grupo sugere um possível papel de corpúsculos lipídicos na patogênese do adenocarcinoma de cólon (ACCIOLY *et al.*, 2008). Foi mostrado que células tumorais de tecidos de adenocarcinoma de cólon humanos apresentam mais corpúsculos lipídicos que células presentes no tecido normal adjacente (ACCIOLY *et al.*, 2008). Além disso, um grande número de corpúsculos lipídicos também foi observado em linhagens tumorais de cólon quando comparada à linhagem epitelial de intestino de rato não transformada IEC-6 (ACCIOLY *et al.*, 2008). Foi notado ainda que o aumento no número de corpúsculos lipídicos era acompanhado de produção *in situ* de PGE2, e que a inibição da biogênese dessas organelas causou redução na taxa de proliferação dessas linhagens (ACCIOLY *et*

al., 2008). Por fim, foram observados um aumento no número de corpúsculos lipídicos e maior produção de PGE2 após transformação da linhagem epitelial IEC-6 com uma versão constitutivamente ativa da oncoproteína H-Ras, enquanto que a inibição da biogênese dessas organelas foi suficiente para reverter o fenótipo hiperproliferativo destas células (ACCIOLY *et al.*, 2008). Esses dados sugerem um papel de corpúsculos lipídicos como produtores centrais de PGE2 em células tumorais de cólon, o que pode ter implicações para a patologia desta neoplasia (ACCIOLY *et al.*, 2008).

A grande diversidade de proteínas funcionais encontradas em corpúsculos lipídicos, incluindo proteínas estruturais, enzimas de metabolismo de lipídios e proteínas de sinalização intracelular, sugere uma participação crucial dessas organelas em diversas funções celulares envolvidas na proliferação e diferenciação celular. Um dos possíveis mecanismos a serem investigados é a coordenação do ciclo celular por corpúsculos lipídicos, e de que forma a sua desregulação pode levar ao desenvolvimento de patologias como o câncer. Alguns trabalhos já mostram indícios de um possível papel dessas organelas na progressão do ciclo celular em hepatócitos de camundongo (FÉRNANDEZ *et al.*, 2006) e leveduras (KURAT *et al.*, 2008). Por ser um intermediário importante entre a homeostase energética e o sistema imune e possuir um papel na inflamação e em doenças relacionadas à obesidade, a leptina deve ter caracterizadas suas funções no metabolismo lipídico e na regulação de corpúsculos lipídicos, para que se entenda o papel deste hormônio na patogênese de doenças como o câncer.

1.1.4.5. Proteômica de corpúsculos lipídicos

Corpúsculos lipídicos compreendem um núcleo de triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol circundados por uma monocamada de fosfolipídios, colesterol e de uma variedade de proteínas (WALTHER *et al.*, 2008; FUJIMOTO *et al.*, 2011). Estudos recentes revelam que estas organelas são estruturas celulares dinâmicas e podem desempenhar um papel no sequestramento de proteínas como um mecanismo que regula a abundância e função das proteínas no interior das células, bem como a homeostase de lipídios. Apesar destas terem sido previamente consideradas como entidades de depósito de lipídios a longo prazo, hoje se sabe que estas organelas celulares estão envolvidasativamente no controle do metabolismo lipídico, em interação direta e dinâmica com outras organelas como por exemplo o retículo endoplasmático e também mitocôndrias (ZEHMER *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011; LARSSON *et al.*, 2012; BRASAEMLE *et al.*, 2012). Durante a última década, tem aumentado o interesse em estudar as interações das

proteínas com corpúsculos lipídicos intracelulares. Os estudos apontam algumas proteínas em comum em vários proteomas, ao passo que algumas proteínas são exclusivas. Em parte, isto pode resultar do fato de que diferentes células e linhagens celulares têm sido utilizadas, sendo os resultados influenciados pelo fato de que certas proteínas são expressas de um modo célula-específico. As proteínas associadas com corpúsculos lipídicos têm sido caracterizadas em diferentes tipos de células de mamíferos, incluindo adipócitos 3T3-L1, células epiteliais mamárias, células hepáticas (HODGES *et al.*, 2010), Caco-2/ enterócitos TC7 (BOUCHOUX *et al.*, 2011), células musculares (ZHANG *et al.*, 2011) e células β produtoras de insulina (LARSSON *et al.*, 2012). Estes estudos indicam que as proteínas encontradas em corpúsculos lipídicos variam de acordo com tipo de célula, embora ocorram características em comum.

As proteínas estruturais da família Plin (KIMEL *et al.*, 2010) estão sempre presentes em corpúsculos lipídicos. A análise proteômica feita a partir de monócitos humanos (U937) detectou muitas proteínas envolvidas no metabolismo de colesterol e triglicerídeos, Rab GTPases e muitas proteínas associadas ao retículo endoplasmático (ER). Além disso, a presença de ribossomos, muitas proteínas associadas à membrana, bem como membranas semelhante a de retículo endoplasmático e também proteínas do lúmen do retículo, indicam que o corpúsculo lipídico podem ser sítios de síntese proteica (WAN *et al.*, 2007). Esta hipótese é suportada pela demonstração de corpúsculos lipídicos exibindo acúmulo de 3H-uridina e detecção de RNA mensageiro por hibridização *in situ* (DVORAK *et al.*, 2003; DVORAK, 2005). A análise proteômica de frações de corpúsculos lipídicos derivados de leucócitos identificou várias proteínas de subunidade ribossômica, bem como fatores de iniciação da tradução (WAN *et al.*, 2007). Além disso, proteínas ribossomais e proteínas que interagem com RNA foram também identificadas nas análises proteômicas de corpúsculos lipídicos obtidos a partir de uma linhagem de hepatoma que expressa a proteína do capsídeo do vírus da hepatite C (SATO *et al.*, 2006). Um estudo recente do proteoma de corpúsculos obtidos a partir de linhagens de ovário de hamster (células CHO K2) revelou um total de 125 proteínas (BARTZ *et al.*, 2007). Juntamente com as proteínas estruturais de corpúsculos lipídicos já conhecidas, foram identificadas várias enzimas envolvidas na síntese de lipídios e proteínas de transporte de membrana. Foram encontradas 18 proteínas Rab, que podem ser classificadas como proteínas dependentes de GTP que controlam o fluxo entre compartimentos de membranas (LIU *et al.*, 2004). Um fosfoproteoma de corpúsculos lipídicos isolados de células HeLa identificou 45 proteínas fosforiladas, incluindo ADRP,

Rab e ATGL (BARTZ *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006). A presença da proteína caveolina foi demonstrada em corpúsculos lipídicos recém-formados a partir de membranas microssomais com perda de microdomínios lipídicos (lipid rafts) (OLOFSSON *et al.*, 2008). Contudo, mais estudos são necessários para identificar o papel da caveolina na biologia destas organelas.

Os corpúsculos lipídicos também podem desempenhar um papel ativo na síntese de lipídios. Enzimas envolvidas na síntese de lipídios têm sido encontradas em corpúsculos isolados de células de mamíferos (BOZZA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010). Através de uma abordagem proteômica diferencial (iTRAQ), frações de corpúsculos isolados de células de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2, e enterócitos/ TC7 que expressam ou não a proteína do núcleo do vírus da hepatite C, foram identificadas 42 proteínas, sendo 21 envolvidas no metabolismo de lipídios (BEILSTEIN *et al.*, 2013). A perilipina 1 encontra-se especificamente em corpúsculos lipídicos de adipócitos. A perilipina 5 também conhecida como OXPAT, é expressa em células que têm uma elevada capacidade de oxidação de ácidos graxos, tais como células do músculo cardíaco. Já a perilipina 2 (ADRP) e perilipina 3 (TIP47) são ubíquos (WOLINS *et al.*, 2006). As enzimas envolvidas na biossíntese do colesterol têm sido rotineiramente identificadas em estudos de proteômica (HODGES *et al.*, 2010; BOUCHOUX *et al.*, 2011; BARTZ *et al.*, 2007). Um estudo comparou corpúsculos ricos em ésteres de colesterol com corpúsculos ricos em TAG utilizando espectrometria de massas em tandem. Neste estudo foram encontradas 278 proteínas em quantidades semelhantes em ambas amostras, incluindo proteínas previamente encontrado em corpúsculos como proteínas de tráfico de membrana, anexina 2, Rab5c e proteínas estruturais, Rab8a, vimentina, tubulinas alfa e beta, chaperonas HSPa8, HSPd1, GRP78, HSP70 e HSP90, bem como ADRP e VDAC1, sendo esta última envolvida na transferência de lipídios no interior de mitocôndrias (KHOR *et al.*, 2014). Vários estudos *in vitro* têm verificado tanto a presença quanto a atividade destas enzimas em corpúsculos lipídicos (SORGER e DAUM, 2002; FUJIMOTO *et al.*, 2007; MOESSINGER *et al.*, 2011;), sugerindo que estas organelas são locais onde ocorrem alguns passos da síntese de lipídios. Juntos, estes resultados não só demonstram as atividades dinâmicas de corpúsculos lipídicos, mas, também fornece informações importantes para uma investigação mais aprofundada do papel desta organela em doenças como obesidade, diabetes e câncer. Sendo necessários maiores estudos mais amplos acerca do papel de proteínas encontradas nos proteomas na dinâmica destas organelas.

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Há anos já é conhecido que o excesso no índice de massa corporal aumenta o risco de doenças cardiovasculares e diabetes tipo dois. Entretanto, no ano de 2001, foi primeiramente estabelecida uma relação entre obesidade e câncer através de estudos epidemiológicos publicados pela International Agency for Research into Cancer (IARC) e World Cancer Research Found (WCRF). Porém, somente após anos, foi aceito que o aumento da adiposidade constitui um fator de risco para o desenvolvimento de câncer (ROBERTS *et al.*, 2010). Adipocinas são moléculas ativas secretadas por adipócitos, que atuam tanto a nível local quanto sistêmico. Leptina e adiponectina são as mais abundantes e mais estudadas adipocinas (Kershaw *et al.*, 2004). No hipotálamo, a leptina ativa a via de PI3K, sendo que, durante a obesidade induzida por dieta, há uma resistência à leptina desencadeada por alterações nesta via de sinalização (METLAKUNTA *et al.*, 2008). Além disso, estudos do nosso grupo demonstraram que a leptina ativa macrófagos de forma dependente da via de PI3K-mTOR e o tratamento com a rapamicina, inibidor de mTOR, inibe o metabolismo lipídico e a produção de mediadores inflamatórios induzidos por leptina (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008). Em estudos de cânceres humanos, o receptor de leptina (ObR) é altamente relacionado à presença de leptina, sugerindo que a malignidade induzida por este hormônio, deve ser regulada via mecanismos autócrinos e parácrinos (FIORIO *et al.*, 2008). A mTOR é uma serina/treonina cinase, pertencente à família das PI3K, importante na proliferação e metabolismo celular (SABATINI *et al.*, 2009). Kershaw e Flier observaram que o complexo mTORC1 é altamente ativo no tecido adiposo de roedores obesos. Sugerindo assim, a participação de mTOR no acúmulo de lipídeos quando o gasto energético é menor que a ingestão alimentar. Além disso, em baixas doses, a rapamicina inibe significativamente o crescimento de tumores com vascularização estabelecida (GUBA *et al.*, 2002). Análogos desta droga têm sido desenvolvidos, como por exemplo, o tensirolimus e everolimus. Em estudos recentes ambos aumentaram a sobrevivência de pacientes com carcinoma renal avançado, levando à aprovação destas drogas para este tipo de câncer (ATKINS, 2004). Os corpúsculos lipídicos também chamados de gotas lipídicas, são inclusões citoplasmáticas, delimitadas por uma monomembrana, associadas a elementos do citoesqueleto (FRANKE *et al.*, 1987; DVORAK e MONAHAN-EARLY, 1992; DVORAK *et al.*, 1992). De forma interessante, o aumento da formação de corpúsculos lipídicos foi também observado em linhagens de adenocarcinoma de cólon e em tecido intestinal obtido de pacientes com este tipo de carcinoma. Além disso, estes

corpúsculos compartmentalizam a enzima COX-2 e a inibição da formação destas organelas é acompanhada por uma inibição na produção de PGE₂ e redução da proliferação celular (ACCIOLY *et al.*, 2008). O aumento no número de corpúsculos lipídicos tem sido descrito em vários tipos de câncer, incluindo adenocarcinoma de cólon, carcinoma cervical escamoso invasivo, tumor de cérebro humano e hepatocarcinoma (BOZZA *et al.*, 2010). Os mecanismos que regulam a formação de corpúsculos lipídicos e sua significância funcional na biologia celular da inflamação e da tumorigênese estão atualmente sob intensa investigação (BOZZA *et al.*, 2010).

Nosso estudo será importante para estabelecer uma correlação entre obesidade e a progressão tumoral, verificando a participação e localização de proteínas de vias de sinalização e enzimas envolvidas no metabolismo lipídico importantes nos eventos de proliferação celular. Até o presente momento, nada foi descrito sobre os efeitos da leptina em corpúsculos lipídicos de células epiteliais, bem como a participação da via de mTOR neste processo. O proteoma de corpúsculos lipídicos com ênfase na validação de proteínas envolvidas com o processo de tradução celular e fenótipo hiperproliferativo também são inovadores. Nossa hipótese é que a via de mTOR possa participar na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por leptina, de maneira similar ao que acontece em macrófagos (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008). Além disso, especulamos que os corpúsculos lipídicos possam servir de sítio de localização de proteínas envolvidas na via de mTOR e tradução de proteínas, bem como proteínas relacionadas a proliferação, metabolismo lipídico, sinalização e ciclo celular, contribuindo para o fenótipo hiperproliferativo observado em tumores.

Na primeira parte do trabalho estudamos o papel da leptina na formação de corpúsculos lipídicos, produção de mediadores inflamatórios e proliferação celular em células epiteliais. Além disso, avaliamos a participação da via de mTOR nestes processos utilizando o inibidor rapamicina.

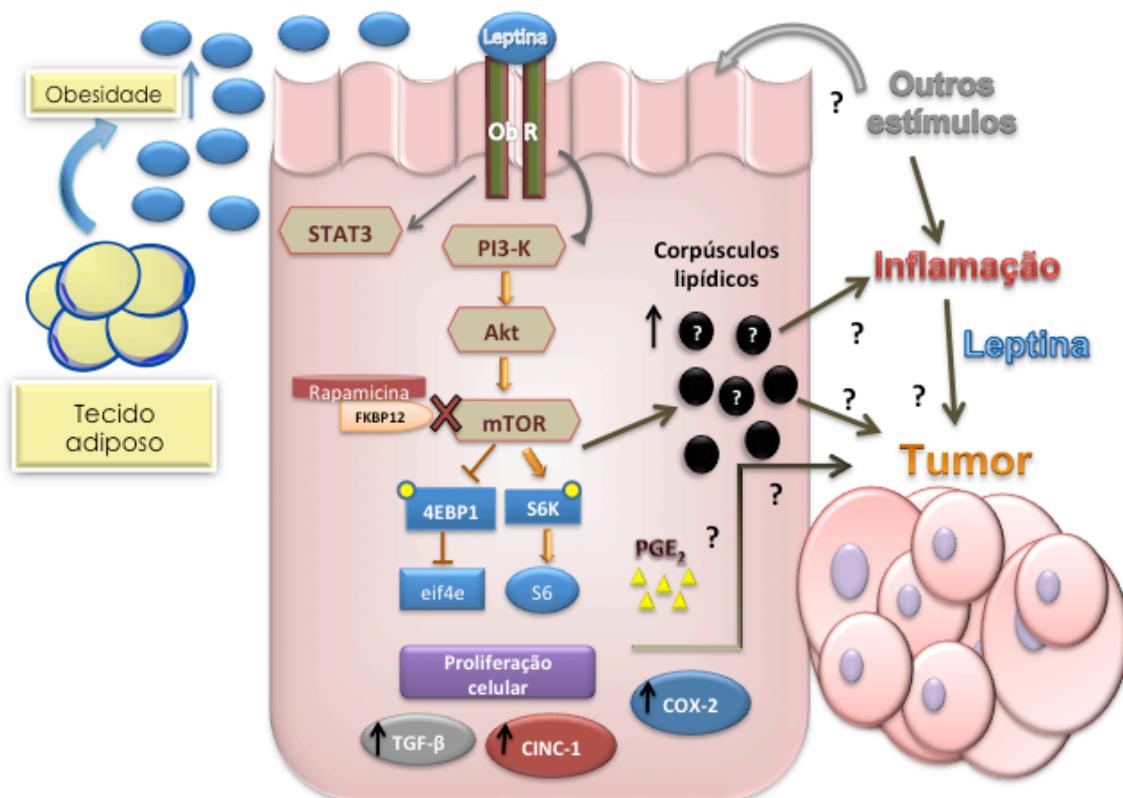


Figura 1.5: Desenho esquemático dos objetivos propostos para a primeira parte da tese. Leptina ativa o receptor de forma longa ObRb e resulta na ativação da célula epitelial levando à biogênese de corpúsculos lipídicos, a secreção de citocinas pró-inflamatórias e ao aumento da proliferação celular, sendo estes eventos de maneira dependente da ativação de mTOR. Estes eventos culminam na geração de um microambiente inflamatório que pode estar envolvido nos mecanismos de carcinogênese relacionados à obesidade

Na segunda parte do trabalho, realizamos o estudo do proteoma descritivo de corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon e a interação das proteínas encontradas. Além disso, realizamos a validação de algumas proteínas da via de mTOR (figura 1.5).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar a relação entre obesidade e carcinogênese avaliando o papel da leptina e dos corpúsculos lipídicos nos mecanismos de regulação do metabolismo lipídico e progressão tumoral.

2.2. Objetivos específicos

Parte 1

- Investigar o efeito da leptina na formação de corpúsculos lipídicos, produção de mediadores inflamatórios e expressão da enzima COX-2 em células intestinais (IEC-6).
- Analisar a ativação da via de mTOR em células epiteliais por leptina e verificar a participação desta via na produção de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios.
- Avaliar a formação de corpúsculos lipídicos e proliferação de células intestinais frente a estimulação com leptina, utilizando inibidores da via de mTOR

Parte 2

- Descrever o proteoma qualitativo preliminar de corpúsculos lipídicos isolados a partir de linhagens de adenocarcinoma de cólon e avaliar a localização subcelular de proteínas da via de mTOR.
- Validar a presença de S6K e mTOR por imunolocalização subcelular ou western blot de frações purificadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

As células da linhagem IEC-6 (doadas pelo Dr. Bruno Diaz, Universidade Federal do Rio de Janeiro) foram mantidas em meio DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco) estéril suplementado com 10% ou 2% de soro fetal bovino (SFB), 100 mg de estreptomicina, 100.000 unidades de penicilina e 0,1 U/mL de insulina humana. As células da linhagem de carcinoma de cólon humano CACO-2 (doadas pelo Dr. João Viola da Divisão de Biologia Celular do Instituto Nacional do Câncer) foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% ou 2% de soro fetal bovino (SFB), 100 mg de estreptomicina, 100.000 unidades de penicilina. As linhagens foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Para retirada da monocamada de células foi utilizada solução de 0,25% tripsina/ 4mM EDTA.

3.2. Cultura de células e estímulo *in vitro*

As células da linhagem IEC-6 foram soltas como descrito acima e a suspensão de células foi recolhida e adicionada à quantidade equivalente de meio DMEM estéril suplementado com 10% de soro fetal bovino. A suspensão foi centrifugada a 1200 rpm a 4°C por 10 min. Após este procedimento, as células foram ressuspendidas em DMEM high-glicose (LGC Biotecnologia) estéril (2% SFB, 1% de penicilina e estreptomicina 100 UI/mL concentração final) e incubadas a 37°C na atmosfera de 5% CO₂, em placas de 6 ou 24 poços, estas últimas contendo ou não lamínulas de 13 mm no fundo de cada poço. Em cada um dos poços das placas de 24, foram adicionados 1,0 mL da suspensão celular ajustada para 1×10^6 células/mL. Após cerca de 18 horas, as células epiteliais foram estimuladas com diferentes concentrações de leptina de rato (Peprotech) (10, 20, 60 e 100 nM) e por tempos distintos (0-96 h), além de tempos mais curtos para análise da fosforilação (0, 5, 10, 20 e 40 min) e tempos mais longos para análise da proliferação celular (0, 24, 48, 72 e 96 h). Após estes tempos, os sobrenadantes das culturas foram removidos e armazenados a -20°C para posterior quantificação de citocinas e mediadores lipídicos. As células foram processadas de acordo com o tipo de análise.

3.3. Tratamentos com inibidores de mTOR

As células epiteliais foram tratadas com diferentes concentrações dos inibidores de mTOR, rapamicina (Calbiochem) e everolimus (LC laboratories) 30 minutos antes da incubação com leptina. Utilizamos também a droga FK-506 (LC laboratories), esta que se liga a FKBP12, porém, não inibe o complexo mTORC1. Todas as drogas foram ressuspendidas em DMSO (Sigma) estéril ou água MiliQ e na hora do uso diluídas em DMEM-high glucose. Os controles receberam apenas o veículo, onde permaneceram a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Os tratamentos cujo veículo foi o DMSO (DMSO 0,01% em DMEM) foi usado como controle.

3.4. Coloração e contagem de corpúsculos lipídicos

As lamínulas contidas nas placas de 24 poços dos grupos controle ou estimulados com leptina (1, 6, 24 h), tratados ou não, foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBS (pH 7,4), por 1 h, em seguida, lavados em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) diluído em água MiliQ e fixados em tetróxido de ósmio a 1,5% diluído em tampão cacodilato por 30 min. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas em água destilada, tratadas com tiocarbohidrazida a 1% por 5 min. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em água destilada e tampão cacodilato 0,1 M e contrastadas em tetróxido de ósmio a 1,5% por 3 min, lavadas novamente com água destilada e montadas com o meio “Aqua Polymount” (Vector). As análises para quantificação dos corpúsculos foram feitas em microscopia de campo claro (objetiva de 100X). Alternativamente, foram contados os corpúsculos lipídicos obtidos de 50 células de campos consecutivos.

3.5. Lise celular e dosagem de proteínas

Após tempos variados de estímulo, os sobrenadantes foram retirados e as células epiteliais aderidas lavadas 2 vezes com PBS 1X (pH 7,4). Após esta lavagem, 50 µl de tampão de lise celular/(1 X 10⁶ células): 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 16 mM CHAPS (detergente); 0,5 mM dithiothreitol (agente redutor); 1 mM EDTA (inibidor de metaloprotease); 1 mM benzamidina HCl (inibidor de soro protease); 1 µg/mL de leupeptina (inibidor de thiol protease); foi adicionado e as células lisadas mecanicamente por raspagem. O lisado celular foi centrifugado em microcentrífuga (Eppendorf) a 800 g/10 min e o sobrenadante armazenado a -20°C. As proteínas foram dosadas pelo “kit” de

dosagem de proteína BCA (Pierce) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Aplicou-se 20 µg de proteínas totais de cada amostra em 60 µL do lisado total no gel.

3.6. Western blotting

Células IEC-6 foram inoculadas na densidade de 1×10^6 em placas de 6 poços após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino. Após os tempos indicados, células foram centrifugadas e lisadas em tampão de ressuspensão (10mM de EDTA, 40 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 60 mM de pirofosfato de sódio) contendo 20 µM de SDS 10%. Os lisados foram aquecidos a 100°C por 5 minutos e guardados a -20°C. Os extratos de proteína total foram misturados com tampão de amostra e separados em géis de poliacrilamida 6 ou 10%. Junto aos extratos foi aplicado um padrão de peso molecular (Rainbow) e este foi submetido à eletroforese a 120 Volts por 90 minutos em SDS-PAGE e transferida para uma membrana de nitrocelulose pré incubada em 100 mL de tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8 e 20 % de metanol em H₂O MiliQ). A transferência foi realizada a 17 Volts por 60 min em sistema semi-seco (Trans-Blot Semi Dry, GE). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com solução bloqueadora de leite desnatado a 5% em TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20). Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST, e incubada por 1 h com o anticorpo primário anti-pP70S6K (Cell Signaling) diluição 1:1000; anticorpo anti-pS6 ribossomal protein (Cell Signaling) 1:1000; anticorpos anti-P70S6K ou anti-S6 total (Cell signaling) na concentração de 1:1000. Após este tempo, as membranas foram lavadas 3 x com TBST, e as proteínas de interesse foram então identificadas pela incubação da membrana com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo (Pierce), conjugado a peroxidase (HRP) diluídos na hora do uso na concentração de 1:10.000. Todos os anticorpos primários e secundários foram diluídos em TBST. Após a lavagem, a detecção foi realizada com o sistema de análise de “Western blotting “Supersignal Chemiluminescence” (Pierce) e a membrana exposta a filme de autoradiografia (GE Healthcare).

3.7. Dosagem de PGE₂

Os níveis de PGE₂ nos sobrenadantes das culturas celulares foram avaliados por ensaio imunoenzimático conforme as instruções do fabricante (Cayman Chemical, Inc). Os poços das placas de 96 foram cobertos com 200 µl de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo diluído em tampão fosfato de potássio (0,05 M) durante o período de uma noite. No dia seguinte, as ligações inespecíficas foram bloqueadas com adição de 200 µl de tampão fosfato de potássio (0,05 M) com BSA 1% e a placa foi mantida sob agitação, por 4 horas. Após este tempo a placa foi lavada com Tween 20 a 0,05% em PBS. Posteriormente, foram adicionados 50 µl das amostras ou 50 µl da PGE₂ na curva-padrão (1 ng/ml, 500, 250, 125, 63, 31 e 16 pg/ml diluídos tampão fosfato de potássio 0,05 M com BSA 1%). O anticorpo anti-PGE₂ (50 µl) e a PGE₂ conjugada com colinesterase foram adicionados e incubados durante cerca de 16 h. O branco recebeu somente o tampão fosfato com 1% de BSA e a PGE₂ conjugada com colinesterase. Em seguida, a placa foi lavada (5x) com tampão fosfato contendo Tween 20 a 0,05%. Em seguida, foram adicionados 200 µl do reagente de Ellmans, que contém o substrato para a enzima colinesterase (diluído em água MilliQ, segundo instruções do fabricante Cayman Chemical), para revelar a reação. A placa foi mantida sob agitação durante 2 h e lida em leitora de placa a 405 nm. Os dados foram analisados com o programa Soft Max Pro, e a dosagem baseada na curva-padrão.

3.8. Dosagem de citocinas e quimiocinas

As dosagens de IL-6, IL10, TNFα, TGF-β e CINC-1 foram realizadas através da técnica de ELISA, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos (Duo set kit – R&D systems). Para essas análises foi utilizado o protocolo da Pharmingen, onde, placas de 96 poços (Nunc) foram revestidas com anticorpos de captura. As placas foram cobertas e incubadas em torno de 16 h na geladeira. No dia seguinte, após 3 lavagens com PBS/Tween, as placas foram bloqueadas com PBS/BSA 1%, para evitar as ligações inespecíficas. Após 1 h de intervalo, as placas foram submetidas novamente a quatro lavagens, com o reagente específico, onde foram adicionadas as curvas-padrão, bem como as amostras (sobrenadantes das culturas celulares). Novamente foram incubadas por 16 h na geladeira. No último dia, após lavagem, os anticorpos de detecção conjugados com biotina foram adicionados, deixando-se por mais 1 h. As lavagens foram feitas novamente e o substrato (avidina-peroxidase) foi colocado para incubação por

cerca de 30 minutos. Em seguida, o revelador (OPD) foi adicionado. A leitura foi feita em leitora de placa a 450 nm. Os dados foram analisados através do programa Soft Max Pro, com as dosagens baseadas nas respectivas curvas-padrão.

3.9. Localização subcelular de COX-2 por microscopia de fluorescência

Após estímulo com leptina ou veículo (24 h), as culturas de células epiteliais foram fixadas em formalina 3% por 10 min, posteriormente as células foram lavadas com PBS, permeabilizadas em Triton 0,05% por 20 min. Após a permeabilização, as células foram lavadas 2X com PBS e incubadas com solução de bloqueio, BSA 1% em PBS por 30 min. Posteriormente incubamos com os anticorpos primários, diluídos na mesma solução de bloqueio, para COX-2 (C-20 santaCruz goat antibody) na diluição de 1:100, após esta incubação as células foram lavadas 3X com PBS e incubadas com os anticorpos secundários, diluídos na solução de bloqueio. Os anticorpos secundários estavam conjugados com os fluoróforos, (anti-goat dylight 488) diluídos 1:3000. As especificidade das marcações foram feitas usando controles negativos pelo uso de isótipos controles IgG de cabra no lugar dos anticorpos primários (Jackson Laboratories). As lamínulas foram montadas em meio de montagem para fluorescência Prolong Gold contendo DAPI para contra-coloração do núcleo e analisadas ao microscópio de fluorescência OLYMPUS equipado com câmera digital e processadas pelo programa “Cell F”.

3.10. Localização subcelular de S6K e mTOR por microscopia confocal

Células CACO-2 foram fixadas nos tempos indicados usando 200 µL de formalina 3% à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, as células fixadas foram permeabilizadas em PBS contendo Triton X-100 0,2%, e bloqueadas em solução contendo Triton X-100 0,2% e albumina bovina 1% em PBS. Após isso, as células foram incubadas sob agitação durante a noite com anticorpo primário monoclonal para mTOR, com diluição de 1:400, e S6K, com diluição de 1:100 em solução de bloqueio, e então lavadas com a mesma solução com três banhos de 10 minutos. Foi feita posteriormente a incubação com o anticorpo secundário Dylight 488 diluído 1:3000 (anti-mTOR) e Dylight 550 diluído 1:5000 (anti-S6K) na solução de bloqueio, seguido por mais um processo de lavagem. Células foram então incubadas em temperatura ambiente com a sonda hidrofóbica fluorescente Bodipy® (1/500) em PBS por 15 minutos. Células foram lavadas com três banhos de PBS por 10 minutos cada. As lamínulas foram montadas em lâminas

utilizando o meio de montagem Prolong Gold antifade mountant contendo DAPI (Life Technologies) e observadas por microscopia confocal (Olympus FV1000).

3.11. Análise da proliferação celular por cristal violeta

Após os tempos de 0, 24, 48, 72 e 96h, as células epiteliais tratadas ou não e estimuladas ou não com leptina, foram lavadas 1X com PBS (pH 7.4) e fixadas com etanol 100% por 10 min. Posteriormente, após secagem do etanol, as células foram incubadas com a solução de cristal violeta a 0,05% (diluída em etanol 20%) por 10 minutos. Depois deste tempo, as mesmas foram lavadas com água destilada sucessivamente por cerca de 5 a 6 vezes, até que o líquido saísse claro e incubadas por 5 minutos com metanol 100%, sendo que neste período a placa foi mantida sob constante agitação. Passado este tempo, a placa foi lida em leitora de placa a 595 nm. Os dados de absorbância foram analisados com o programa Soft Max Pro.

3.12. Isolamento de corpúsculos lipídicos por fracionamento subcelular

Células da linhagem CACO-2 (20×10^6) foram cultivadas em garrafas de 150cm^2 em 90% de confluência. As mesmas foram tripsinizadas, centrifugadas, lavadas por duas vezes com PBS 1X e lisadas em tampão TEE-KCl (25 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 1 mM EDTA and 5 mM EGTA/ pH 7.4). Foi adicionado coquetel inibidor de proteases (Complete® protease inhibitor cocktail - Roche) e fosfatase e as células foram rompidas por cavitação em nitrogênio a 700ψ (psi) por 15 minutos em gelo. Ao cavitado foi adicionado 1,5 mL de sacarose 1,08 M. Após homogeneizar, foi adicionada, vagarosamente, 1 mL de sacarose 0,27 M, seguida de 1 mL sacarose 0,135 M. O gradiente de sacarose foi centrifugado em ultracentrífuga (Optima Max-XP / Beckman Coulter) a 150 000 x g, 4°C, por 80 minutos (Brasaemle and Wolins, 2006). A ultracentrifugação em gradiente de sacarose gera sete frações subcelulares, conforme desenho abaixo:

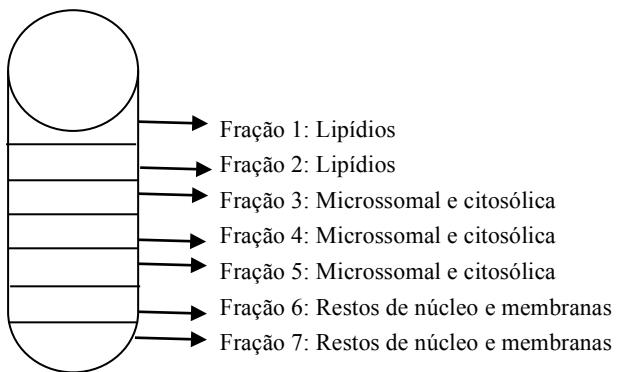


Figura 3.1: Esquema de fracionamento subcelular após ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

As frações foram recolhidas cuidadosamente e, com uma amostra de 20 μ L de cada uma, foi realizada a dosagem de LDH (lactato desidrogenase) com o kit CytoTox 96 (Promega), com leituras em 470 nm nos tempos 0, 5, 10, 15, 25 e 35 minutos. Espera-se que nas frações 1 e 2 não haja variação na quantificação de LDH ao longo dos tempos, pois LDH é uma enzima citoplasmática e estas frações são as ricas em lipídios e não devem possuir atividade desta enzima. Como o objetivo é avaliar a presença de proteínas de interesse nas frações, deve-se realizar a precipitação de proteínas. Para isto, misture-se cada uma das frações ao ácido tricloroacético (TCA- Sigma) de forma a obter uma concentração final do mesmo de 10%. Agitar vigorosamente as amostras e incubamos por 1 hora em gelo. Após este tempo, centrifugar a 7 500 x g, 4°C, 10 minutos. Desprezar os sobrenadantes e ressuspender em acetona gelada, seguindo com agitações vigorosas, centrifugações e adições de acetona por mais duas vezes. Por fim, deixar a acetona evaporar e ressuspender os pellets em tampão de corrida 1X.

3.13. Análises de ciclo celular e conteúdo de DNA sub-G0 por iodeto de propídio

Células IEC-6 cultivadas com 10% de soro estimuladas ou não por leptina foram soltas da monocamada com tripsina, lavadas uma vez com PBS, e marcadas com iodeto de propídio na presença de NP-40. Análise do conteúdo de DNA foi feito coletando 10.000 eventos para análise de ciclo celular e 20.000 eventos para análise de DNA sub-G0 utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur e o software CellQuest (BD Biosciences).

3.14. Análise de ciclo celular por incorporação de BrdU

Células IEC-6 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas à densidade de 2×10^6 células (IEC-6) em garrafa de 75 cm², sendo mantidas em cultura com meio contendo 10% de soro fetal bovino até adesão (0h) ou até os tempos indicados (12 h, 24 h, 36 h, 48 h). Trinta minutos antes da fixação, células foram incubadas com 20 nM de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) em meio DMEM com 10% de soro, após o qual foram imediatamente lavadas com PBS, contadas, e fixadas em etanol gelado 100%, sendo então mantidas à -20°C por pelo menos 24 horas. Após esse período, 5×10^5 células foram lavadas em solução de soroalbumina bovina (BSA) 1% em PBS e tratadas com HCl 2N contendo 0,5% de Triton X-100 por 30 minutos para desnaturação do DNA, sendo esta reação posteriormente inativada com tetraborato de sódio (Bórax) 0,1 M. Células foram novamente lavadas com solução de BSA 1%, e incubadas no escuro e em temperatura ambiente por uma hora com o anticorpo monoclonal anti-BrdU conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína), com diluição de 1:20 em solução de BSA 1% e Tween 20 0,5% em PBS. Após incubação, células foram lavadas com solução de marcação com iodeto de propídio (0,5 mg/ml de ribonuclease A, 0,02 mg/ml de iodeto de propídio, e Triton X-100 0,1% em PBS). Após marcação, células foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur e o software CellQuest (BD Biosciences).

3.15. Marcação e quantificação de corpúsculos lipídicos por Oil Red O

Células IEC-6, 1×10^5 células foram plaqueadas em lamínulas de 13 mm de diâmetro após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino. Estas foram então fixadas com 200 µl de formalina 3,7% por 10 minutos, lavadas três vezes com água destilada, e incubadas com propilenoglicol 100% por cinco minutos. Células foram então incubadas com Oil Red O (0,5% em propilenoglicol) por dez minutos, e então incubadas com propilenoglicol 100% por mais cinco minutos. As lamínulas foram posteriormente lavadas três vezes com água destilada, e montadas com meio Prolong Gold antifade mountain contendo DAPI (Life Technologies). Para quantificação de corpúsculos lipídicos em cada tempo analisado, foram fotografadas por microscopia de fluorescência (microscópio OLYMPUS BX60) cinquenta células escolhidas aleatoriamente por cinco campos diferentes, utilizando o mesmo período de exposição pré-estabelecido para cada fotografia. Posteriormente, as fotografias foram convertidas para escala de cinza

utilizando o software AdobePhotoshop®, e corpúsculos lipídicos foram quantificados através do software Fiji/ImageJ.

3.16. Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram comparados através do teste de ANOVA e Newman-Keuls, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

3.17. Dosagem de proteínas pelo método Qubit

A concentração de proteína nas amostras de corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon (CACO) foi mensurada por fluorometria através do método Qubit (Fluorometer Qubit® 2.0. Invitrogen). Esta metodologia é capaz de quantificar amostras que apresentem um intervalo dinâmico linear de cerca de três ordens de grandeza (12,5 a 5.000 µg/mL) e apresenta pequena variação de proteína para proteína.

3.18. Preparação de digestos trípticos para análise por espectrometria de massas

Volumes equivalentes a dez microgramas de extrato proteico oriundo de corpúsculos lipídicos de células CACO-2 e a 10 µg de soroalbumina bovina (controle positivo - 1 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA) foram separados em novos microtubos e completamente secos por liofilização. Todas as amostras foram dissolvidas em 20 µL de 0,4 M de bicarbonato de amônio / 8 M de uréia e reduzidas em 20 mM de ditiotreitol (DTT) em água, a 37°C, por 3 h. Em seguida, as amostras foram alquiladas em 67 mM de iodoacetamida (IAA) em água, por 15 min, no escuro, à temperatura ambiente. Para diluir a uréia para 1 M, foram adicionados 130 µL de água deionizada. As amostras foram incubadas com 1 µL de tripsina (0,2 µg/µL em ácido acético 50 mM, Promega, EUA), a 37°C, por 20 h. Os tripsinizados foram acidificados com ácido trifluoroacético (TFA) para uma concentração final de ácido de 1% (v/v) e aplicados em microcolunas de aproximadamente 10 µL, preparadas em ponteiras de 200 µL e equilibradas com 1% (v/v) de TFA no laboratório (LARSEN *et al.*, 2006). Após lavagem com 0,1% (v/v) de TFA, os peptídeos foram eluídos em 40 µL de 0,1% (v/v) de TFA em 70% (v/v) de acetonitrila. Os peptídeos foram completamente secos em concentrador de amostras sob vácuo SpeedVac (Thermo Savant, EUA) e armazenados a -20°C.

3.19. Identificação de proteínas por nanocromatografia acoplada à espectrometria de massas de alta resolução

Primeiramente os extratos peptídicos foram ressuspensos em 40 µL de ácido fórmico a 1% (v/v). O nanocromatógrafo utilizado foi um sistema nLC-Easy II (Proxeon Biosystems, Dinamarca) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap XL (Thermo, EUA). Quatro microlitros de amostra foram inicialmente aplicados em uma pré-coluna de 2 cm de comprimento (100 µm de diâmetro interno) empacotada com partículas de sílica de diâmetro de 5 µm, poro de 200 Å, (Magic C18 AQ, Michrom Bioresources, EUA) e, em seguida, separada em coluna de 10 cm de comprimento (75 µm de diâmetro interno), empacotada com a mesma matriz em coluna PicoFrit com ponta de 30 µm (New Objective, EUA). As amostras foram carregadas em 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 2% de acetonitrilo (eluente A), na pré-coluna, com fluxo de 2 µL/min, enquanto que a separação cromatográfica ocorreu a 200 nL/min. Os peptideos foram eluídos com um gradiente de 2 a 60% de 0,1% (v/v) de FA em acetonitrilo (eluente B) durante 32 min, seguido de gradiente de 40 a 80% B em 4 min e lavagem a 80% B por 2 min. Na entrada do espectrômetro, a voltagem do spray foi ajustada para 1,9 kV, sem fluxo de gás auxiliar e com a temperatura do capilar a 200 °C. As voltagens do capilar e das lentes foram ajustadas para 48 e 100 V, respectivamente. Os espectros dos precursores, modo MS (full scan MS), foram adquiridos com um microscan no analisador Orbitrap, com resolução de 60.000 (Full Width Half Maximum, FWHM para *m/z* 400), valor de Automatic Gain Control (AGC) definido para 5x105 e tempo máximo de injeção de 500 ms. Até 10 íons precursores mais abundantes de cada varredura (de intervalo de *m/z* 300 a 1.700) foram sequencialmente submetidos à fragmentação por dissociação induzida por colisão (Collision Induced Dissociation, CID) e os íons-fragmento foram analisados no Linear Trap Quadrupole (LTQ) no modo MS/MS, usando os seguintes parâmetros: valor de AGC definido para 1x104, tempo de preenchimento máximo de 100 ms e limite de sinal mínimo de 10.000 contagens. A fragmentação do íon precursor foi realizada utilizando a energia de colisão normalizada de 35%, janela de isolamento de 2 *m/z*, tempo de ativação de 30 ms e tempo de permanência de um íon na lista de exclusão (exclusão dinâmica) de 45 s. Íons de carga única e íons sem estado de carga definido não foram submetidos a MS/MS.

Os espectros MS/MS obtidos foram extraídos, desconvoluídos para determinação do estado de carga e transformados para massas monoisotópicas utilizando a ferramenta pXtract version 2.0. Todos os espectros foram submetidos ao processo de identificação utilizando a ferramente de busca Mascot (Matrix Science, Londres, GB; versão 2.4.1). A

ferramenta foi configurada para buscar o banco de dados Uniprot da espécie *Homo sapiens*, versão de 8 de outubro de 2014, contendo 44.151 entradas, assumindo a digestão da amostra por tripsina. Utilizou-se tolerâncias de massas de 10 ppm e 0,6 Da, para os íons precursores e íons-fragmento, respectivamente. A carbamidometilação de cisteína foi especificada como uma modificação variável. O software Scaffold (versão 4.3.4, Proteome Software Inc., EUA) foi utilizado para validar as identificações obtidas pela ferramenta Mascot. Foram aceitas identificações de peptídeos para um *false discovery rate* (FDR) menor ou igual a 1% e o mesmo para o nível de proteína, sendo suas probabilidades calculadas pelo algoritmo *Protein Prophet* (NESVIZHSKII *et al.*, 2003). Proteínas com peptídeos similares que não puderam ser diferenciadas baseando-se apenas na análise dos espectros MS/MS foram agrupadas para satisfazer o princípio da máxima parcimônia. Proteínas que compartilharam evidência de identificação peptídica estatisticamente significativa foram agrupadas em *clusters*.

3.20. Interactoma ou mapa de interações de proteínas

O mapa de interações das proteínas encontradas no proteoma descritivo foi realizado utilizando o programa String versão 9.1 (<http://string-db.org/>). Através do número de acesso (acession number) e/ou nome do gene relacionado à uma proteína (gene name) depositados no banco de dados utilizado UNIPROT, o String identifica as interações relacionadas às proteínas, gerando um mapa destas interações. Para esta análise, utilizamos os “*gene names*” das proteínas identificadas no proteoma descritivo. O programa String reconheceu parte dos “*gene names*” e reportou possíveis interações. Dentro deste mesmo programa foram realizadas análises baseadas no banco de dados de ontologias genéticas, o Gene Ontology (<http://geneontology.org/>). Avaliamos os termos encontrados para os processos biológicos e funções moleculares mais relevantes neste estudo e, a partir destes, novas redes de interações foram filtradas e reportadas.

Para a análise da rede de interação entre as proteínas encontradas no proteoma, realizamos a conversão da entrada das proteínas (ID) no gene correspondente (gene name) de um total de 370 proteínas. O programa string reconheceu 297 proteínas de acordo com os genes dados pelo Uniprot e observou 1745 interações. Dentro deste mesmo programa foram realizadas análises baseadas no banco de dados Gene Ontology para avaliar as redes de interações das proteínas de acordo com processos biológicos e funções moleculares.

4. RESULTADOS

4.1. Leptina induz a formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais

A formação de corpúsculos lipídicos pode ser desencadeada por vários estímulos inflamatórios e infecciosos. Estudos de Maya-Monteiro e colaboradores, demonstrou que a leptina induz a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos *in vitro* e também acúmulo da proteína ADRP (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008). Com o objetivo de estabelecer o efeito da leptina em células epiteliais, foi utilizada a linhagem celular IEC-6, que são células epiteliais intestinais de rato. Essa linhagem foi escolhida por não apresentar fenótipo de transformação, como crescimento na ausência de estímulo ou perda de inibição da proliferação por contato. Com base nestes dados e objetivando estabelecer o efeito da leptina em nível periférico, avaliou-se o efeito da estimulação *in vitro* com leptina sobre células epiteliais intestinais, através de diferentes doses e por diferentes intervalos de estímulo. Analisando a dinâmica de formação de corpúsculos lipídicos através da coloração por ósmio, a leptina foi capaz de induzir um aumento do número de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais de modo dependente do tempo estudado, mostrando-se significativo de 1 a 24 horas de estímulo (Fig. 4.1).

Na figura 4.2, observa-se a contagem de corpúsculos lipídicos em células epiteliais após 6 horas de estímulo, sob as concentrações de 10, 20, 50 e 100 nM de leptina. A leptina foi capaz de induzir um aumento do número de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais em todas as concentrações utilizadas, sendo a dose de 20nM considerada dose ótima. Esta indução mostrou-se significativa de 10 nM a 100 nM de concentração.

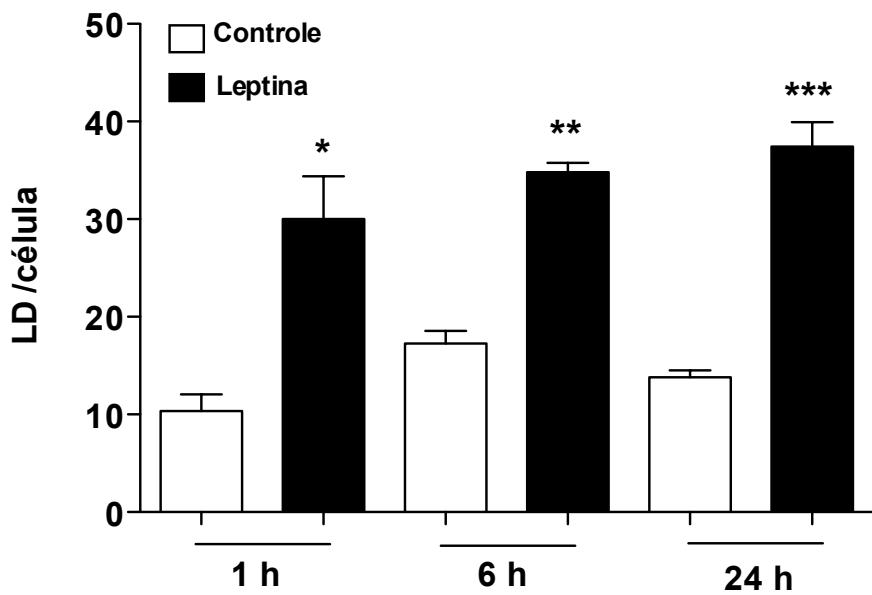


Figura 4.1 – Cinética de formação de corpúsculos lipídicos às 1, 6 e 24 h após estímulo com leptina. As células epiteliais intestinais de rato foram estimuladas ou não por leptina, na dose de 20 nM e incubadas a 37°C na presença de 5% de CO₂, durante os tempos indicados. Após estes tempos as células epiteliais foram coradas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); *diferença significativa entre os grupos controles e estimulados por leptina; ($p<0,05$).

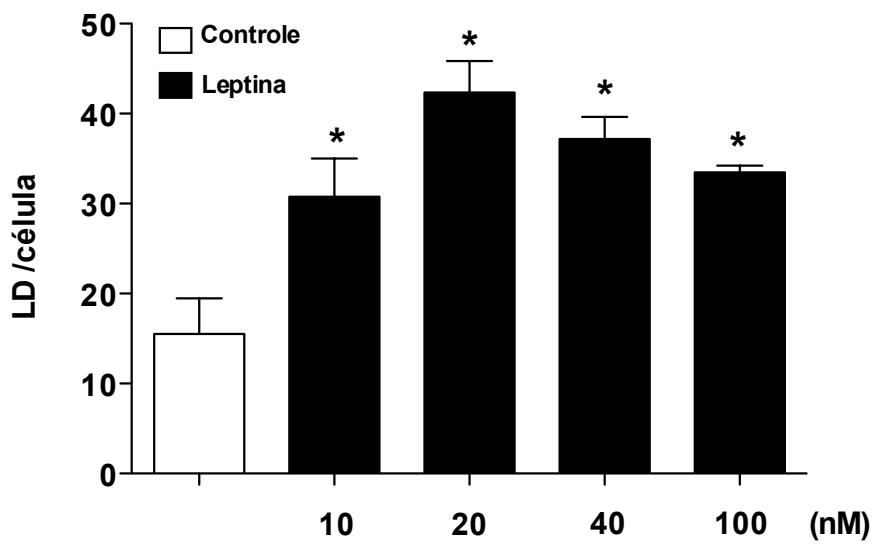


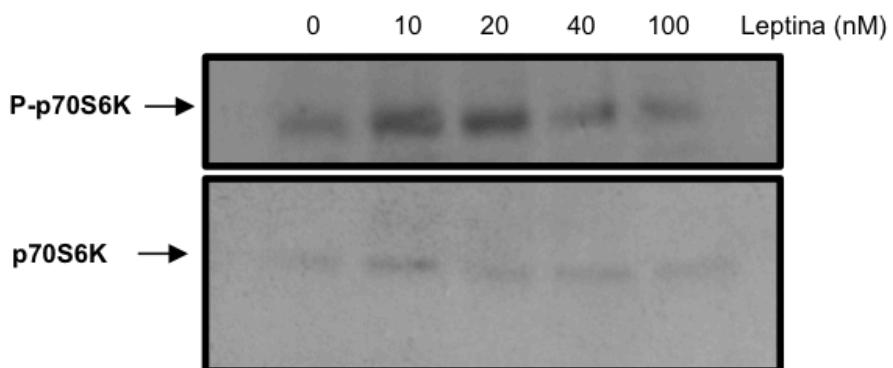
Figura 4.2 – Curva de dose da formação de corpúsculos lipídicos após estímulo com leptina. As células epiteliais intestinais de rato foram estimuladas ou não por leptina, nas doses de 10, 20, 50 e 100 nM e incubadas a 37°C na presença de 5% de CO₂, durante 6 h. Após este tempo, as células epiteliais foram coradas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); *diferença significativa entre os grupos controles e estimulados por leptina; ($p<0,05$).

4.2. Avaliação da fosforilação de P70S6K em células epiteliais durante a estimulação com leptina

Maya-Monteiro e cols., 2008, demonstraram que a leptina ativa a via de mTOR em macrófagos peritoneais. Para avaliar a ativação da via de mTOR em células intestinais frente à estimulação com leptina, utilizamos as análises de *Western blotting*, onde verificamos a fosforilação de P70S6K durante a estimulação desencadeada por leptina *in vitro*. A figura 4.3 mostra que a leptina induz aumento da fosforilação de P70S6K (76 KDa), uma cinase ativada por mTOR, e este aumento se mostrou dependente do tempo e da dose de leptina, mostrando um considerável aumento da fosforilação de P70S6K já a partir de 10 minutos, e principalmente em 20 minutos de estímulo. Além disso, a leptina na dose de 20 nM induziu uma elevada fosforilação desta cinase, o que não acontece nas células dos grupos controle, onde a fosforilação de P70S6K é quase indetectável. Como controle foi avaliada a expressão total da proteína P70S6K, onde tanto na curva de dose quanto na curva de tempo, esta não apresentou variação na expressão.

A

IEC-6



B

IEC-6

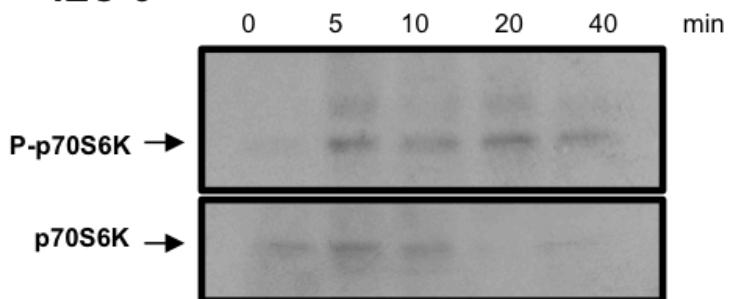


Figura 4.3 – Análise da fosforilação de P70S6K por “Western blotting” em células epiteliais estimuladas com leptina *in vitro*. (A) As raias estão representadas pelo grupo estimulado com leptina nas concentrações de 10, 20, 40 e 100 nM. (B) As raias estão representadas pelo grupo estimulado com leptina (20 nM) nos tempos de 0, 5, 10, 20 e 40 minutos. Para a separação das proteínas, os lisados celulares foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, foram aplicados 30 µg de proteínas totais. Para a detecção de P70S6K utilizou-se anticorpo policlonal de coelho anti-pP70S6K, diluição (1:1000) ou anti-P70S6K (1:10.000).

4.3. Leptina induz aumento da síntese de PGE₂, CINC-1 e TGF-β em células epiteliais intestinais

Diante destes dados, avaliamos o efeito da estimulação *in vitro* com a dose de 20 nM de leptina nos níveis de PGE₂, CINC-1, TGF-β, IL-6 e TNF-α. Os níveis de PGE₂ foram quantificados no sobrenadante das culturas por ensaio imunoenzimático (EIA). Para a quantificação das citocinas utilizamos o ensaio de ELISA. A leptina induziu um aumento dos níveis de PGE₂ avaliados nos sobrenadantes das culturas de células epiteliais no tempo de 6 h em relação às células não estimuladas, além disso, este hormônio foi capaz de produzir um aumento nos níveis de CINC-1, uma quimiocina de rato semelhante a IL-8 de humanos, no tempo de 6 h de estímulo. Este efeito não é observado no tempo anterior de 1h e no tempo tardio de 24 h (Fig. 4.4).

4.4. Análise da participação da via de mTOR na sinalização de leptina em células epiteliais intestinais

O complexo mTORC1 é importante para os efeitos da leptina no hipotálamo. A inibição deste complexo pela rapamicina, inibe o sinal anorexígeno da leptina, modulando a ingesta alimentar (COTA e cols., 2006). Nós verificamos o papel da via de mTOR na sinalização por leptina em células epiteliais através da análise da fosforilação de P70S6K. Identificamos que a mTOR possui um papel na sinalização desencadeada por leptina, uma vez que as células epiteliais tratadas com rapamicina e everolimus (análogo de rapamicina), inibidores de mTOR, apresentaram uma inibição da fosforilação de P70S6K. Utilizamos a droga FK-506, objetivando verificar a especificidade da ativação de mTOR. FK-506 se liga à FKBP12, como a rapamicina, porém, não desencadeia modificações na via de sinalização de mTOR (Fig. 4.5).

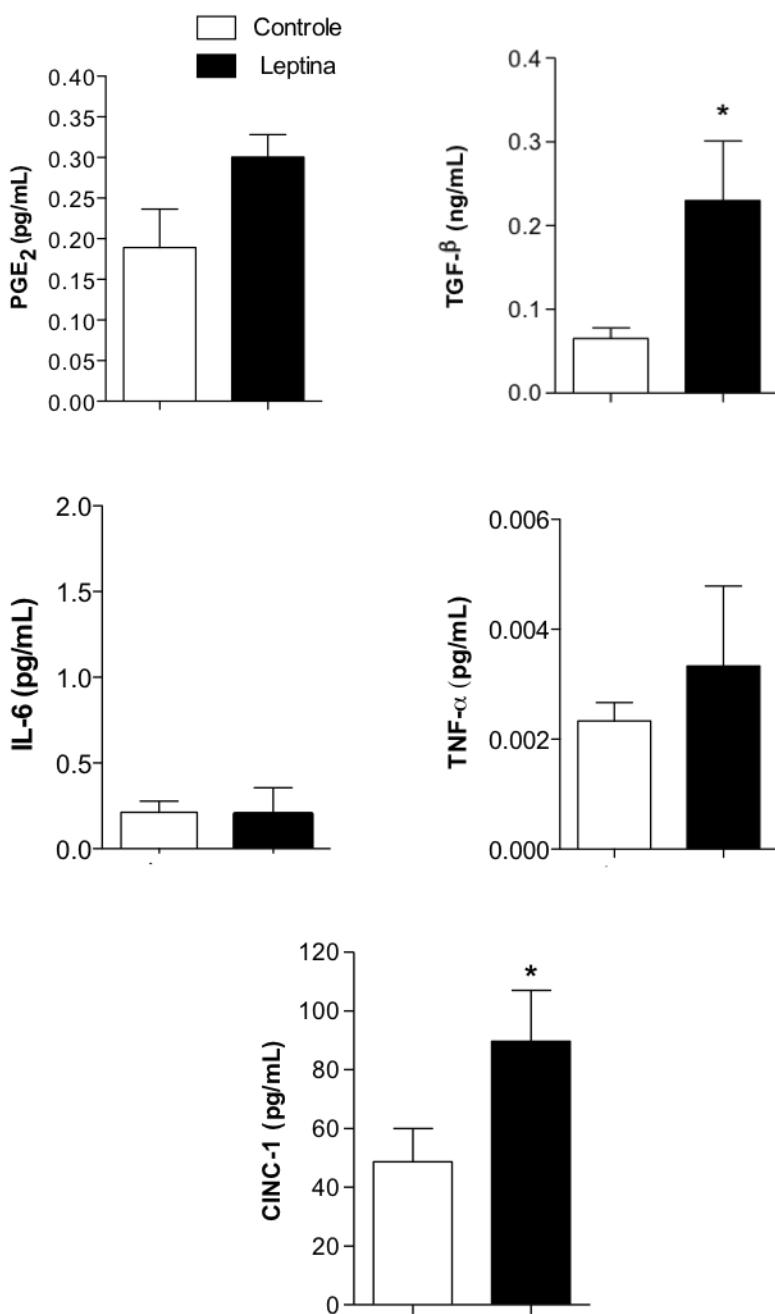
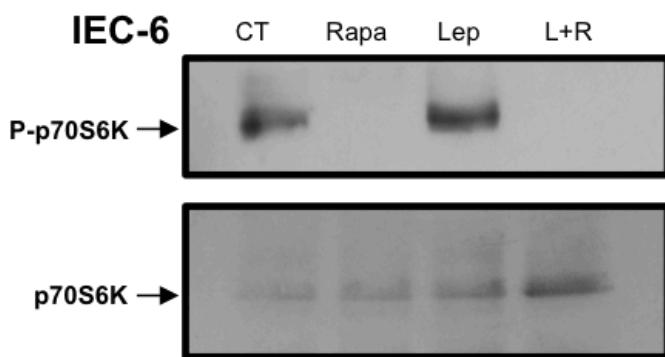


Figura 4.4 – Produção de PGE₂ e citocinas após estimulação por leptina. As células epiteliais intestinais foram estimuladas ou não por leptina, 20 nM, a 37°C na presença 5% de CO₂, durante 6 horas. Os níveis de CINC-1, TGF-β, IL-6 e TNF-α foram detectados por ELISA e os níveis de PGE₂ foram detectados através de ensaio imunoenzimático (EIA). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); *diferença significativa entre os grupos controle e estimulado por leptina; ($p<0,05$).

A



B

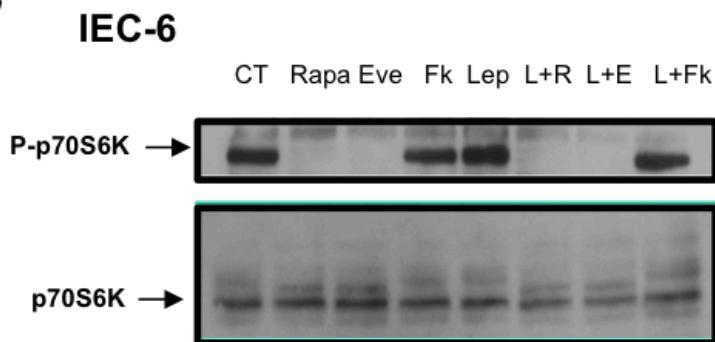


Figura 4.5 – Análise da fosforilação de P70S6K por *Western blotting* em células epiteliais estimuladas por leptina. (A) As raias estão representadas pelos grupos não estimulados (CT), estimulados (Lep), tratados por rapamicina (Rap) e tratados por rapamicina e estimulados por leptina (L+R), ambos na dose de 20 nM. (B) As raias estão representadas pelos grupos estimulados (Lep), tratados por rapamicina e estimulados por leptina (L+R), tratados por everolimus (análogo da rapamicina) e estimulados por leptina (L+E) e tratados por Fk-506 e estimulados por leptina (L+Fk), ambos na dose de 20 nM. A droga Fk-506 foi utilizada para verificar a especificidade da ativação de mTOR. Para a separação das proteínas, os lisados celulares foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Foram aplicadas 30 µg de proteínas totais. Para a detecção de pP70S6K utilizou-se anticorpo de coelho anti-pP70S6K na diluição de (1:1000).

4.5. Mecanismos envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais induzidos por leptina

Para investigar o papel de mTOR nos mecanismos de formação de corpúsculos lipídicos induzidos por leptina em células epiteliais intestinais, nós utilizamos inibidores de mTOR (rapamicina e everolimus) e a droga FK-506. Na figura 4.6, observa-se a formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais após tratamento com inibidores de mTOR, rapamicina e everolimus, bem como com a droga FK-506, após 6 horas de estímulo com o hormônio leptina. Através da análise da formação de corpúsculos lipídicos tanto por coloração com tetróxido de ósmio (A), quanto por Oil red O (B e C), a leptina foi capaz de induzir um aumento do número de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais. Além disso, confirmando o resultado de (A), o tratamento com rapamicina foi capaz de reduzir significativamente a área de corpúsculos lipídicos por célula, enquanto a leptina aumenta a mesma. O tratamento com os inibidores de mTOR, rapamicina e everolimus, inibiu a formação destas organelas (A). Já o tratamento com a droga FK-506 não alterou o aumento no número de corpúsculos lipídicos induzido por leptina nestas células. Estes resultados demonstram um papel essencial para mTOR na modulação do metabolismo lipídico em células epiteliais.

4.6. Papel da leptina e via de mTOR na expressão de COX-2 e TGF-β

A fim de investigar o papel da leptina e da via de mTOR na expressão da enzima COX-2 e produção do fator TGF-β em células epiteliais intestinais, utilizamos o inibidor de mTOR, rapamicina. Na figura 4.7 (A), observa-se que a leptina é capaz de aumentar a expressão da enzima COX-2 em células epiteliais intestinais e o tratamento com o inibidor de mTOR, inibe a expressão desta enzima. Este efeito foi observado através de imunolocalização. Em (B), foi possível observar que a leptina aumenta a produção da citocina TGF-β em células epiteliais e o pré-tratamento com rapamicina foi capaz de inibir a produção deste mediador. Estes resultados demonstram um papel essencial de leptina e da via de mTOR no aumento da expressão da enzima COX-2, uma importante enzima envolvida com o metabolismo lipídico e produção do fator TGF-β, em células epiteliais intestinais.

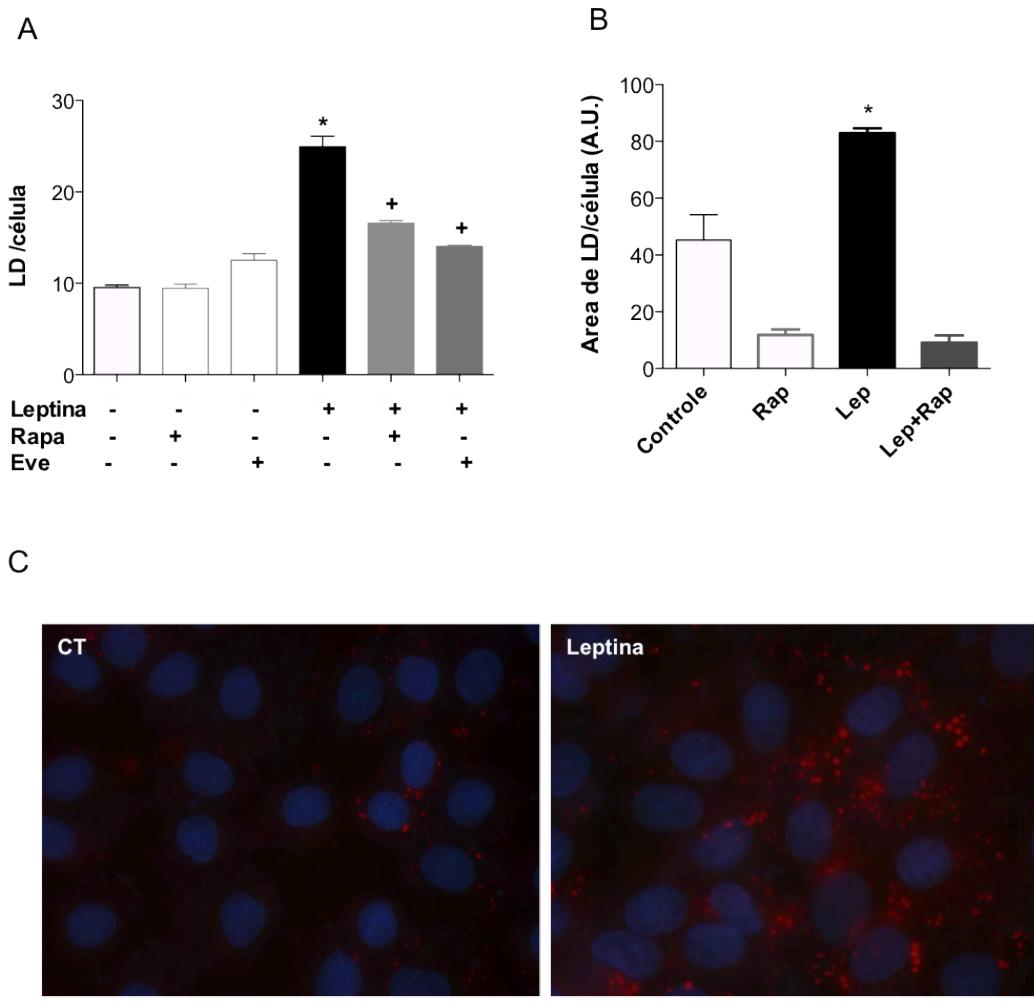
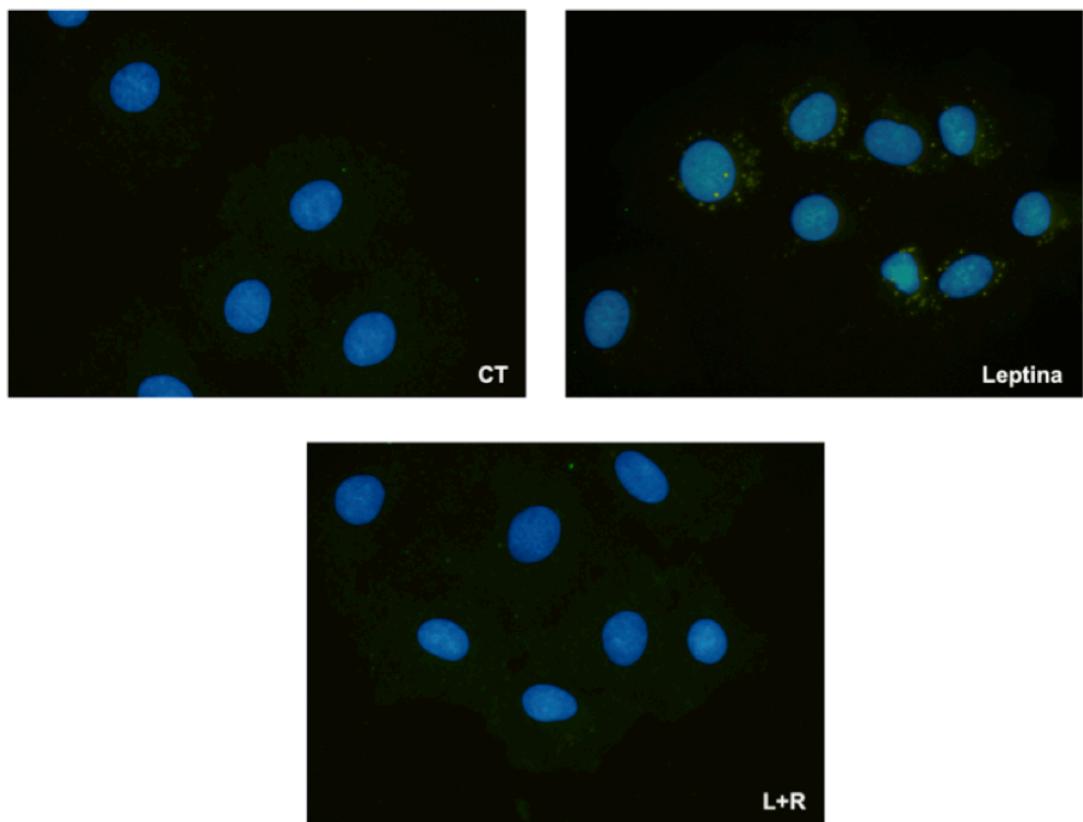


Fig. 4.6 - Formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais induzido por leptina é dependente da atividade de mTOR. (A) Contagem de corpúsculos lipídicos em células IEC-6 após incubação *in vitro* com leptina por 6h (20 nM) na presença ou não de rapamicina (20 nM) ou everolimus (20 nM), como indicado. * Diferenças estatisticamente significativas entre a leptina e controle; + Diferença estatisticamente significativa entre os tratados com rapamicina e o grupo leptina. + Diferença estatisticamente significativa entre o tratado com everolimus e o grupo leptina. (B) Área de fluorescência de corpúsculos lipídicos corados com ORO após incubação com leptina por 6 h, na presença ou não de rapamicina. As imagens foram analisadas com o programa com Fiji / ImageJ. *, Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo leptina e o controle. (C) Fluorescência de corpúsculos lipídicos corados com ORO após incubação com leptina por 6 h. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); ($p<0,05$). (CT: controle; Rapa: rapamicina ; Lep: leptina ; L + R : Leptina+ rapamicina).

A



B

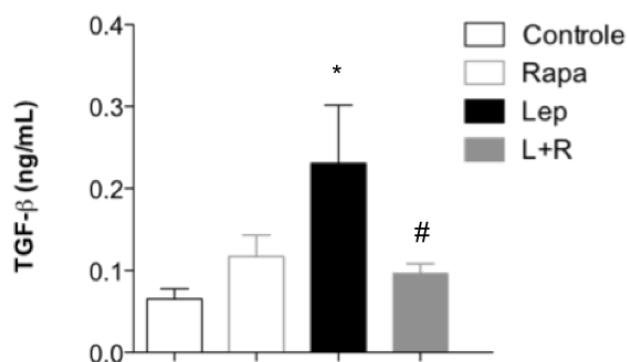


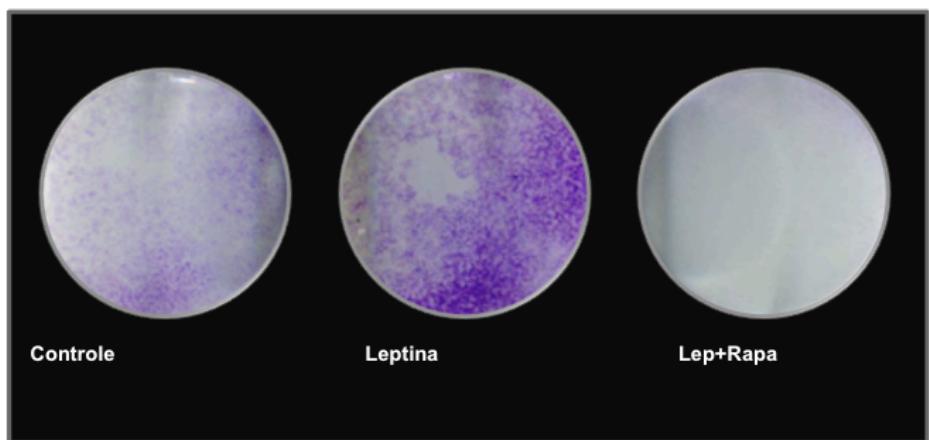
Figura 4.7 – Estudo do envolvimento de mTOR na expressão de COX-2 e produção de TGF- β após estimulação com leptina: (A) Imunolocalização de COX-2 em células epiteliais estimuladas por leptina e tratadas com rapamicina, revelada com anticorpo anti-COX-2. Aumento de 100X. (B) Células epiteliais intestinais pré-tratadas ou não com rapamicina, foram estimuladas durante 6 horas por leptina (20 nM) ou avaliadas como controle. Os níveis de TGF- β foram detectados por ELISA. * Diferenças estatisticamente significativas entre a leptina e controle; # Diferença estatisticamente significativa entre os tratados com rapamicina e o grupo leptina. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM). (CT: Controle/ L+R: Leptina + Rapamicina).

4.7. Papel da leptina e via de mTOR na proliferação e crescimento celular

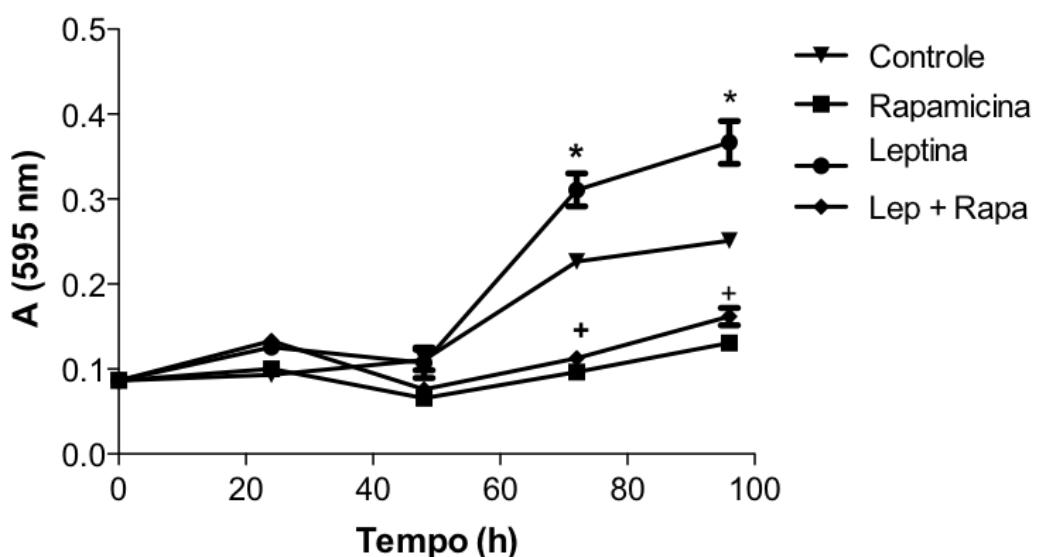
Vários estudos demonstram uma superativação da via de mTOR em vários tipos de tumores, além disso, a leptina é capaz de promover a migração e invasão de células de carcinoma hepatocelular, através da ativação da via de PI3K/Akt. A fim de investigar o papel da via de mTOR e da leptina na proliferação de células epiteliais intestinais, nós utilizamos o inibidor de mTOR, rapamicina. Na figura 4.8, observa-se que a leptina é capaz de aumentar a proliferação de células epiteliais intestinais e o tratamento com o inibidor de mTOR inibe este efeito. Estes resultados demonstram um papel essencial para mTOR ativada por leptina na proliferação e possível transformação de células epiteliais, estabelecendo parte da relação entre obesidade e câncer.

A expansão celular depende de um equilíbrio entre morte celular e proliferação. Uma vez observado um aumento importante no número total de células mediante tratamento com leptina (Fig. 4.8, A-C), decidimos avaliar a progressão do ciclo celular. A distribuição de células ao longo das fases do ciclo celular foi analisada por ensaio de incorporação de iodeto de propídeo e análise de FACS. Detectamos um acúmulo de células na fase S após tratamento com leptina (Fig. 4.8, D) e o tratamento com rapamicina leva a um importante arresto de células IEC-6 na fase G0/G1 do ciclo celular, sem resultar em morte celular significativa. Estes resultados indicam que a ativação da via mTOR possui um papel importante no aumento da proliferação de células epiteliais de cólon, e, portanto, podem contribuir para a promoção da carcinogênese relacionada à obesidade.

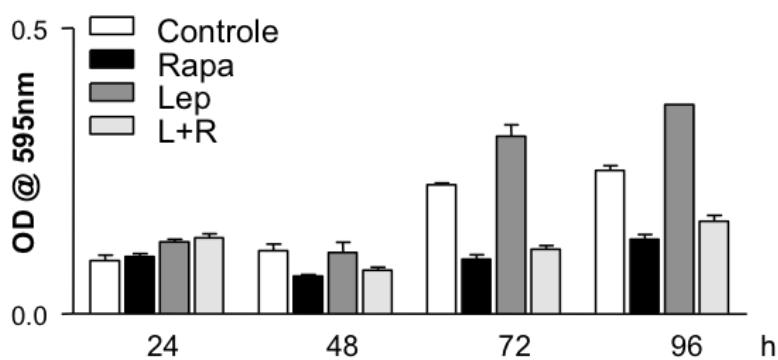
A



B



C



D

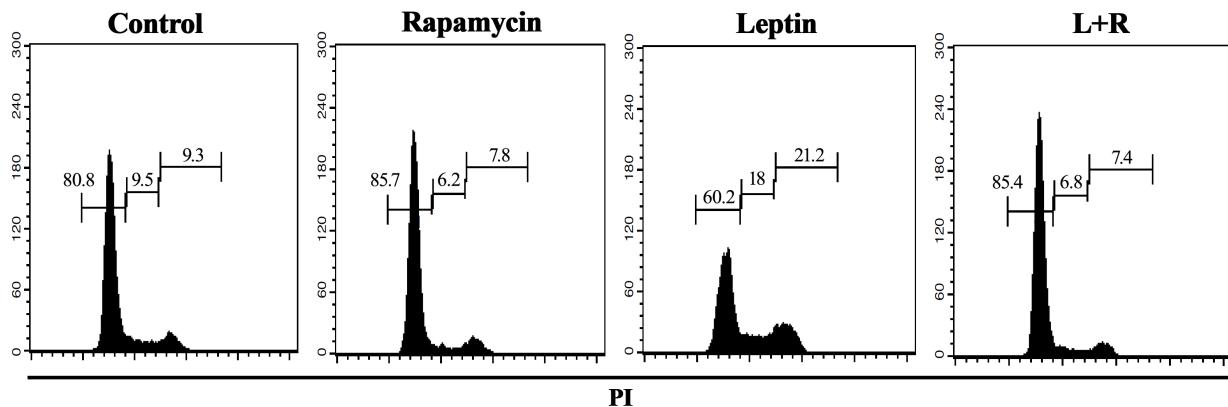


Figura 4.8 – Análise da participação da via de mTOR na proliferação mediante estimulação com leptina: (A) Células epiteliais intestinais cultivadas e tratadas com rapamicina na dose de 20 nM e estimuladas ou não por leptina, na dose de 20 nM, sendo incubadas por 120 horas. A proliferação foi avaliada através da coloração com cristal violeta. (B) Células epiteliais intestinais de rato foram cultivadas e tratadas com rapamicina na dose de 20 nM e estimuladas ou não por leptina, na dose de 20 nM, sendo incubadas por 0, 24, 48, 72 e 96 horas. A proliferação foi avaliada através da absorbância obtida a 595 nm, após coloração com cristal violeta. (C) Células epiteliais intestinais de rato foram cultivadas e tratadas com rapamicina na dose de 20 nM e estimuladas ou não por leptina, na dose de 20 nM, sendo incubadas por 0, 24, 48, 72 e 96 horas. A proliferação foi avaliada através da absorbância obtida a 595 nm, após coloração com cristal violeta (D) Células epiteliais foram incubadas com leptina (20nM) na presença ou ausência de rapamicina (20nM) por 48 h. Posteriormente, as células foram marcadas com iodeto de propídeo para análise por citometria de fluxo. A percentagem de células em cada estágio do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) está indicada na figura. Os resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); * diferença significativa entre os grupos controle e estimulado por leptina; + diferença significativa entre os grupos leptina e tratados com rapamicina; ($p<0,05$).

4.8. Análise qualitativa preliminar de linhagens de adenocarcinoma de cólon utilizando uma abordagem proteômica *shotgun* simplificada

O tamanho amostral utilizado neste trabalho foi reduzido, dada a limitação de tempo e de amostra, mas suficiente para uma análise exploratória inicial. Foram identificadas, pela máxima parcimônia, 370 proteínas que foram agrupadas em 295 *clusters* proteicos. Dentre as principais proteínas estruturais de corpúsculos lipídicos já identificadas e associadas a corpúsculos lipídicos de outros tipos celulares, e encontradas presente em corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon, estão perilipina-2/ADRP e perilipina-3/TiP47 (Tabela 4.1). Também foram encontradas diversas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, incluindo síntese de colesterol e triglicerídeos, dentre elas estão lanosterol sintase, ligase 3 de ácidos graxos de cadeia longa, NADPH desidrogenase e proteína ligante de retinol 4.

Como visto na tabela 4.1, duas proteínas de citoesqueleto, cadeia alfa da tubulina e actina, previamente descritas em corpúsculos lipídicos (WAN *et al.*, 2007), também foram identificadas em nosso estudo. Além disso, outras proteínas importantes de citoesqueleto como miosina, prelaminina A/C, profilina 1, vinculina, alfa actinina, proteína relacionada a actina 3C, tropomiosina 3, plectina, proteína de capeamento (F-actina), filamina B e catenina foram encontradas no proteoma descritivo de corpúsculos lipídicos. As chaperonas calnexina, BiP e proteína 70 de choque térmico estavam presentes nas amostras de corpúsculos lipídicos. Muitas proteínas envolvidas no tráfego de vesículas foram identificadas, incluindo vários membros da grande família Rab de proteínas, sendo membros da família Ras de oncogenes. Dentre elas estão, Rab 1A, Rab 2A, Rab 5B, Rab 7A e VAT-1 (proteína de tráfego transmembranar). Estas proteínas foram previamente associadas a corpúsculos lipídicos de outras células. De forma interessante, foram encontradas diversas proteínas envolvidas na tradução como por exemplo a S6 cinase e também componentes ribossomais, como proteínas da subunidade 60S e 40S ribossomais, fatores de alongamento e vários fatores de iniciação da tradução, muitos deles ainda não descritos em corpúsculos lipídicos. Também foram identificadas diversas proteínas mitocondriais como NADPH desidrogenase, hexoquinase 1, glicerol-3-fosfato desidrogenase, NADPH desidrogenase, succinato desidrogenase, glicose 6-fosfato 1-desidrogenase, dentre outras. Proteínas nucleares também foram encontradas em corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon, sendo elas Histona H3, H2A, H2B e também RNA helicase DDX39B. Proteínas relacionadas a ubiquitinação também foram encontradas no proteoma destas organelas, proteínas como ubiquitina

conjugada a enzima E2, ubiquitina OS, proteína modificadora 1 associada a ubiquitina e proteína UBBP4. Já nesta mesma categoria, chaperonas como DJ1/ PARK7, HSP70, HSP60 e proteína dissulfeto isomerase A3 também foram encontradas. Quanto a sinalização celular, foram encontradas diversas proteínas importantes, dentre elas HMGB1, HMGB2, calmodulina, proteína cinase dependente de cálcio e calmodulina, S100 A6, adenilato cinase isoenzima 1, RhoA, correpressor associado a Dr1 e serina/treonina fosfatase 2A. Com relação a ciclo celular e câncer foram encontradas as proteínas CDC42, RNA helicase DDX39B, subunidade 1 do complexo ativador de proteassoma, proteína tumoral controlada tradicionalmente (TPT1) e NDGR1. Proteínas de diversas classes também foram encontradas, como calcineurina B, anexina, vimentina, flotilina 2, citocromo P450, calmodulina, glutationa S-transferase, dentre outras.

4.9. Análise da rede de interação de proteínas (Interactoma) descritas no proteoma de corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon

O mapa de interações das proteínas encontradas no proteoma descritivo foi realizado utilizando o software string. Para a análise da rede de interação entre as proteínas encontradas no proteoma, realizamos a conversão da entrada das proteínas (ID) no gene correspondente (gene name) de um total de 568 proteínas. O programa string reconheceu 314 proteínas de acordo com os genes e observou 2238 interações. Dentro deste mesmo programa foram realizadas análises baseadas no banco de dados Gene Ontology para avaliar as redes de interações das proteínas de acordo com processos biológicos e funções moleculares (Fig. 4.10).

Outro processo importante evidenciado foi a sinalização celular. Dentro dessa categoria foram encontrados 60 genes relacionados a transdução de sinal de uma forma geral. Foram encontrados 36 genes relacionados a transdução de sinal intracelular e 20 genes relacionados a transdução de sinal mediada por pequenas GTPases.

Com relação ao processo de tradução de proteínas, 42 genes de proteínas envolvidas em funções moleculares relacionadas a este processo foram encontradas e 83 interações foram observadas no total (Fig. 4.11)

Tabela 4.1 Lista de proteínas identificadas em frações de corpúsculos lipídicos isolados de células de adenocarcinoma de cólon (CACO-2)

	Proteína	Swiss-prot
Estruturais de CL	Perilipina 3/ TiP47	K7EL96_HUMAN, K7ER39_HUMAN
	Perilipina 2/ ADRP	Q5SYF3_HUMAN, Q5SYF4_HUMAN, Q5SYF5_HUMAN
Metabolismo lipídico	Lanosterol sintase	C9J315_HUMAN
	Ligase 3 de ácidos graxos de cadeia longa (ACSL3 / FACL3)	H7BYZ7_HUMAN
	NADPH desidrogenase	H3BNV2_HUMAN
	Proteína ligante de retinol 4	Q5VY30_HUMAN
	Ligase 4 de ácidos graxos de cadeia longa (ACSL4 / FACL4)	H0Y9A0_HUMAN
	PAF acetilhidrolase IB / LpPLA2	J3KNE3_HUMAN
	Acetil-coenzima A sintetase 1-acilglicerol-3-fosfato O- aciltransferase (AGPAT)	H7BZY9_HUMAN
	Acil coenzima A tioester hidrolase	B4DUX0_HUMAN
	Acetil-CoA aciltransferase D-3-fosfoglicerato dehidrogenase	Q5SZU1_HUMAN
	Retinol dehidrogenase 2	G3V145_HUMAN
	Enolase	F5H0C8_HUMAN
Proteínas de citoesqueleto	Actina	A6NL76_HUMAN, Q5T8M8_HUMAN
	Cadeia alfa 4A da tubulina	C9JEV8_HUMAN, C9JJQ8_HUMAN, C9JQ00_HUMAN
	Miosina	J3QRS3_HUMAN
	Prelaminina A/C	Q5TCI8_HUMAN
	Profilina 1	I3L3D5_HUMAN
	Vinculina	Q5JQ13_HUMAN
	Alfa actinina 1	H9KV75_HUMAN
	Proteína relacionada a actina 3C	H7C4J1_HUMAN
	Tropomiosina 3	J3KN67_HUMAN
	Plectina	E9PMV1_HUMAN
	Proteína de capeamento (F-actina)	F8W9N7_HUMAN
	Filamina B	E7EN95_HUMAN
	Catenina	G3XAM7_HUMAN
Chaperonas/ Ubiquitinação	DJ1 / PARK7	H0Y9H1_HUMAN
	HSP70	I3L0K7_HUMAN
	HSP60	E7ESH4_HUMAN
	Proteína dissulfeto isomerase A3	H7BZJ3_HUMAN
	Ubiquitina conjugada a enzima E2	F8VQQ8_HUMAN
	Ubiquitina OS	B4DV12_HUMAN, F5GXK7_HUMAN, F5GYU3_HUMAN, F5H041_HUMAN, F5H265_HUMAN, F5H2Z3_HUMAN, F5H388_HUMAN, F5H6Q2_HUMAN, F5H747_HUMAN, J3QKN0_HUMAN, J3QS39_HUMAN, J3QTR3_HUMAN, Q96C32_HUMAN
	Proteína modificadora 1 associada a ubiquitina	Q5JRR6_HUMAN
	Proteína UBBP4	J3QLP7_HUMAN, J3QRK5_HUMAN

Sinalização celular	HMGB1	Q5T7C4_HUMAN, Q5T7C6_HUMAN
	HMGB2	D6R9A6_HUMAN
	Calmodulina	D6R938_HUMAN, E9PBG7_HUMAN, E9PF82_HUMAN
	Proteína cinase dependente de cálcio e calmodulina II - CAMKI	D6R938_HUMAN, E9PBG7_HUMAN, E9PF82_HUMAN
	S100 A6	R4GN98_HUMAN
	Adenilato Cinase isoenzima 1	Q5T9B7_HUMAN
	RhoA (proteína transformadora de ligação ao GTP)	E9PQH6_HUMAN, Q5JR05_HUMAN, Q5JR07_HUMAN, Q5JR08_HUMAN
	Correpressor associado a Dr1	C9JCC6_HUMAN, E9PNCC7_HUMAN, E9PQX9_HUMAN
	Serina/ treonina fosfatase 2A	H0YDG7_HUMAN
Ciclo celular/ câncer	CDC42	Q5JYX0_HUMAN
	RNA helicase DDX39B	H0Y400_HUMAN
	Subunidade 1 do complexo ativador de proteassoma / PSME1	H0YM70_HUMAN
	Proteína tumoral controlada tradicionalmente / TPT1	Q5W0H4_HUMAN
	NDGR1	E5RGM5_HUMAN, E5RIM2_HUMAN, E5RIR1_HUMAN, E5RIV1_HUMAN
Chaperonas	DJ1 / PARK7	H0Y9H1_HUMAN
	HSP70	I3L0K7_HUMAN
	HSP60	E7ESH4_HUMAN
	Proteína dissulfeto isomerase A3	H7BZJ3_HUMAN
Ribossomais/ Tradução	Proteína ribossomal L18 da subunidade 60S	F8VUA6_HUMAN, G3V203_HUMAN, H0YHA7_HUMAN, J3QQ67_HUMAN
	Proteína ribossomal S5 da subunidade 40S	M0R0F0_HUMAN, M0R0R2_HUMAN
	Fator de elongamento 1 beta	C9JZW3_HUMAN
	Fator de iniciação da tradução eucariótico 5A	I3L397_HUMAN, I3L504_HUMAN
	Fator de iniciação eucariótico 4A	E7EQG2_HUMAN
	Fator de iniciação da tradução eucariótico 4 gamma	D3DQV9_HUMAN, H0Y3P2_HUMAN, H0YCH5_HUMAN
	Proteína S6 cinase alfa-2 / S6K	B7Z3B5_HUMAN, F2Z2J1_HUMAN
Tráfego de vesículas	Rab 7A	C9J592_HUMAN
	Rab 5B (Membro da família RAS de oncogenes)	F8VUA5_HUMAN
	Rab 1A (Membro da família RAS de oncogenes)	E7END7_HUMAN
	Rab 11A	H3BMH2_HUMAN, H3BSC1_HUMAN
	Rab2A	H7C125_HUMAN
	VAT-1	K7EM19_HUMAN, K7ENX2_HUMAN
Proteínas nucleares	Histona H3	K7EK07_HUMAN
	Histona H2A	C9J0D1_HUMAN
	Histona H2B	U3KQK0_HUMAN
	RNA helicase DDX39B	Q5STU3_HUMAN

Mitocondriais	NADPH desidrogenase	H3BNV2_HUMAN
	Hexoquinase 1	E7ENR4_HUMAN
	Glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial	F8W6E4_HUMAN
	NADPH desidrogenase	H3BNV2_HUMAN
	Succinato desidrogenase	D6RFM5_HUMAN
	Adenilato cinase 2 mitocondrial	F8VZG5_HUMAN, F8W1A4_HUMAN
	Citocromo c oxidase mitocondrial	H3BRM5_HUMAN, H3BV69_HUMAN
	Subunidade alfa da ATP sintase mitocondrial	K7EK77_HUMAN
	Isocitrato desidrogenase (NADP) mitocondrial	H0YL11_HUMAN
	Glicose 6-fosfato 1-desidrogenase	E7EM57_HUMAN, E7EUI8_HUMAN
	Serina hidroximetiltransferase mitocondrial	G3V5L0_HUMAN
	Lanosterol sintase	C9J315_HUMAN
Variadas	Calcineurina B	F5GX29_HUMAN, HOYKE7_HUMAN, HOYNG9_HUMAN
	Anexina	H0YM50_HUMAN
	Vimentina	B0YJC4_HUMAN
	Proteína ligante de retinol 4	Q5VY30_HUMAN
	Flotilina 2	K7EKW9_HUMAN
	Citocromo P450	E7EVL8_HUMAN
	Glutathiona S-transferase	A8MX94_HUMAN
	Calmodulina	E7ETZ0_HUMAN
	Proteína reguladora de actina CAP-G	E7ENU9_HUMAN

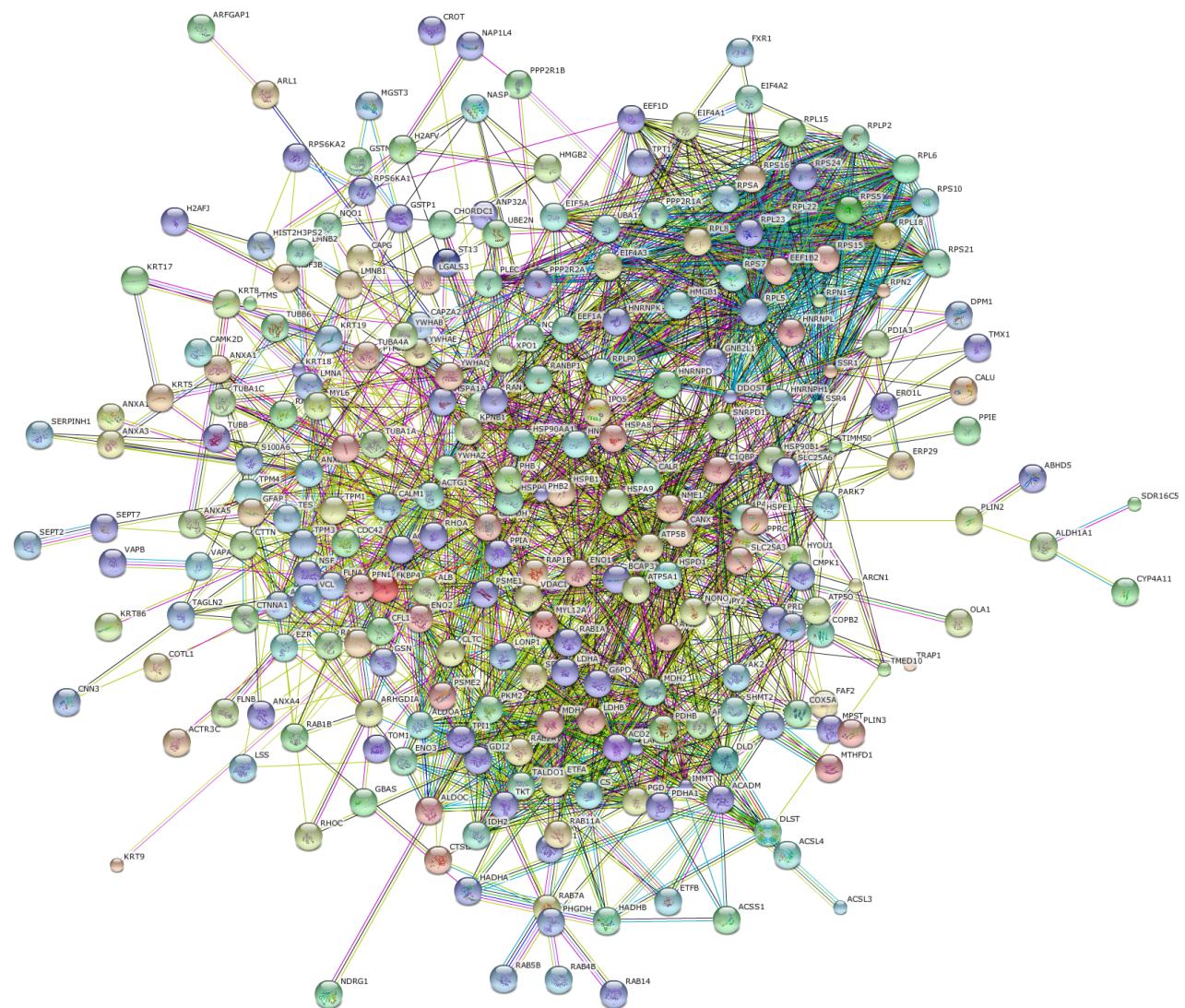


Figura 4.10 – Rede de interação das proteínas encontradas no proteoma descritivo de corpúsculos lipídicos oriundos de células de adenocarcinoma de cólon. O interactoma das proteínas encontradas no proteoma descritivo foi realizado utilizando o software string. O programa string reconheceu 314 proteínas de acordo com os genes e observou 2238 interações.

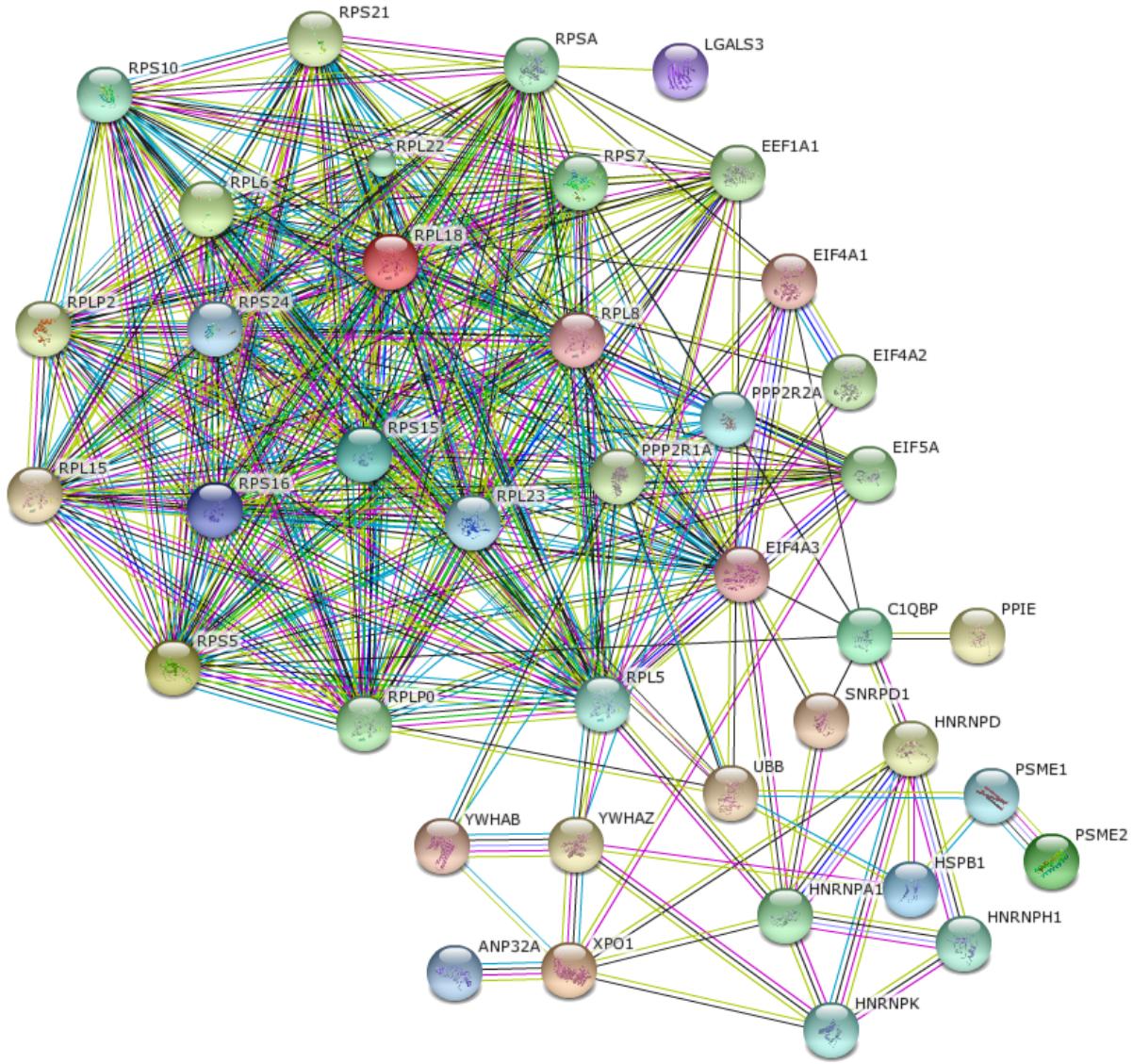


Figura 4.11 – Rede de interação das proteínas envolvidas na tradução encontradas no proteoma descritivo de corpúsculos lipídicos oriundos de células de adenocarcinoma de cólon. O interactoma das proteínas envolvidas no processo de tradução celular encontradas no proteoma descritivo foi realizado utilizando o software string. O programa string reconheceu 40 proteínas de acordo com os genes e observou 263 interações.

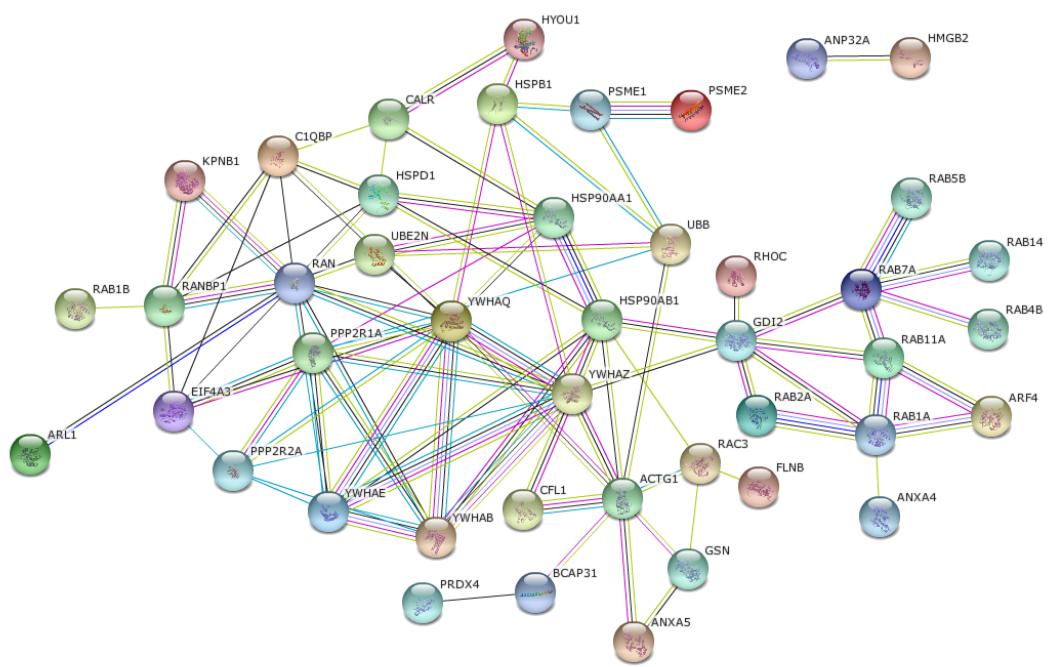


Figura 4.12 – Rede de interação das proteínas envolvidas na sinalização celular encontradas no proteoma descritivo de corpúsculos lipídicos oriundos de células de adenocarcinoma de cólon. O interactoma das proteínas encontradas no proteoma descritivo foi realizado utilizando o software string. O programa string reconheceu 52 proteínas de acordo com os genes e observou 92 interações.

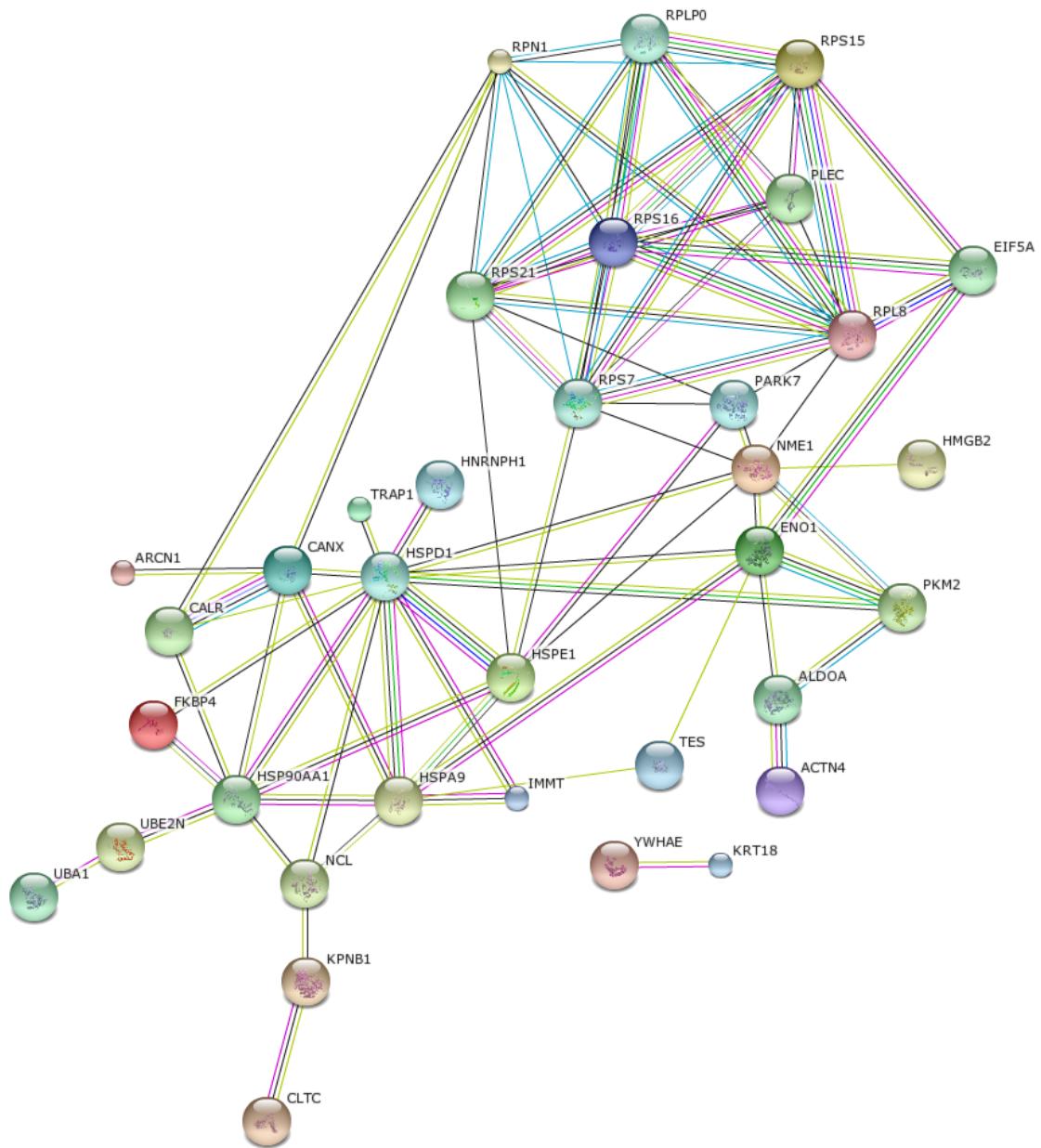
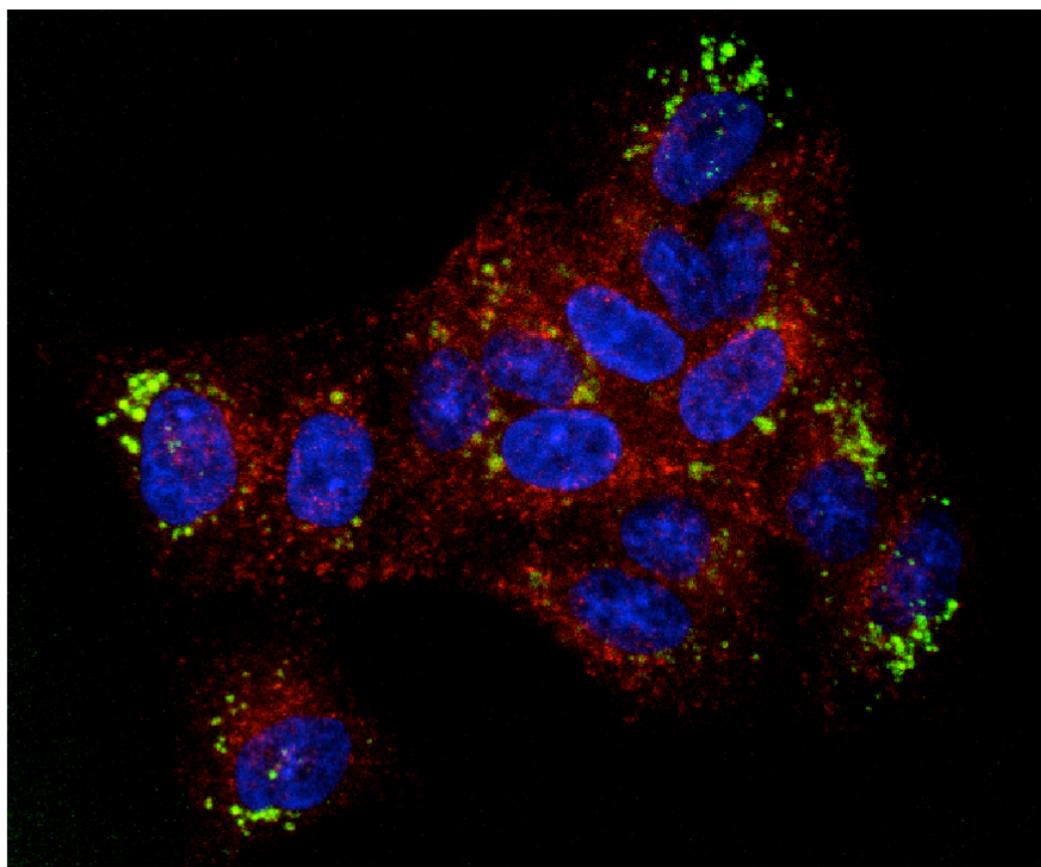


Figura 4.13 – Rede de interação das proteínas envolvidas na sinalização celular encontradas no proteoma descritivo de corpúsculos lipídicos oriundos de células de adenocarcinoma de cólon. O interactoma das proteínas encontradas no proteoma descritivo foi realizado utilizando o software string. O programa string reconheceu 42 proteínas de acordo com os genes e observou 83 interações

4.10. Proteínas da via de mTOR estão localizadas em corpúsculos lipídicos de linhagens de adenocarcinoma de cólon

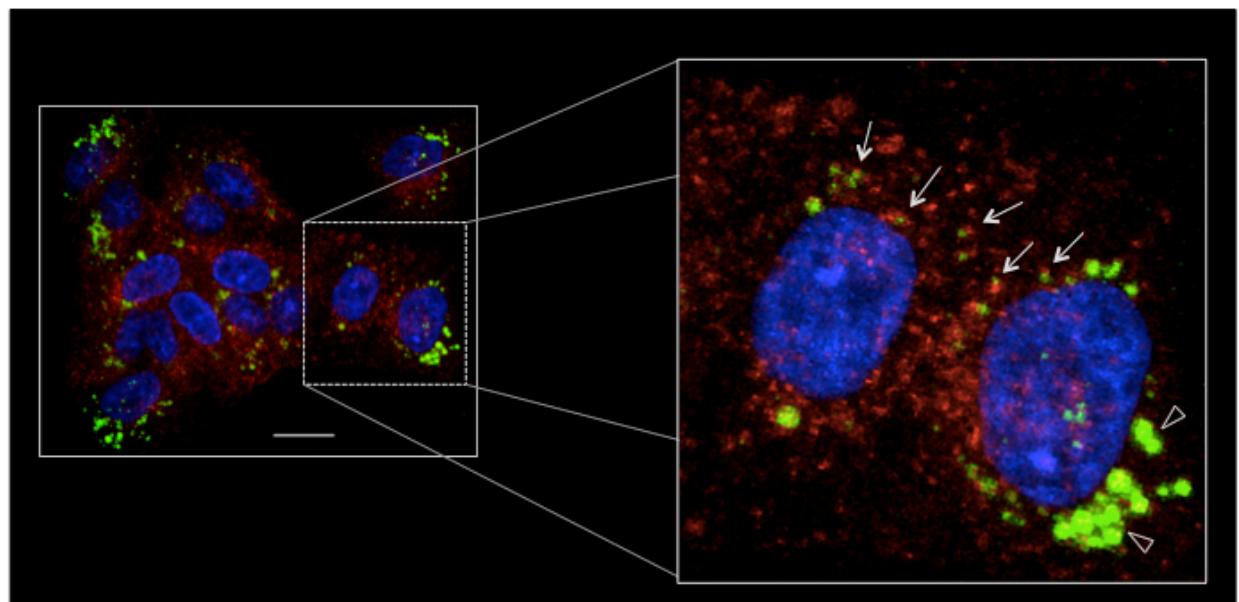
Um e cols., 2004, demonstraram que animais deficientes em S6K apresentam uma importante redução de tecido adiposo, devido ao aumento na lipólise, no gasto energético e redução no acúmulo de lipídeos em corpúsculos lipídicos presentes em adipócitos (Um *et al.*, 2004). Nossos resultados mostram que o estímulo de células epiteliais com leptina leva a um aumento da formação de corpúsculos lipídicos, sendo este mecanismo dependente da via de mTOR. Recentemente o papel de corpúsculos lipídicos na síntese proteica foi sugerido devido à observação da localização de RNA mensageiro e de ribossomos associados aos corpúsculos lipídicos (WAN *et al.*, 2007). A mTOR está envolvida na ativação das vias de ativação da tradução de proteínas e de proliferação celular. Sendo assim avaliamos se proteínas da via de mTOR se localizam em corpúsculos lipídicos. A localização subcelular de mTOR e S6K em células CACO-2 foi investigada por dupla marcação fluorescente utilizando anticorpos anti-P70S6K e anti-mTOR e marcadores de organelas (DAPI para núcleo; bodipy para corpúsculos lipídicos, avaliados por microscopia confocal). Dosamos LDH (Lactato desidrogenase) de todas as frações. A proteína S6K se mostrou muito próxima de corpúsculos lipídicos em células de adenocarcinoma de cólon (Fig. 4.14, A). Já a proteína mTOR não parece estar localizada em corpúsculos lipídicos, mas, também se mostrou próxima destas organelas, circundando principalmente os corpúsculos lipídicos de menor tamanho (Fig. 4.14, B). A localização de S6K foi confirmada por western Blotting através de amostras da fração lipídica obtida por fracionamento subcelular em gradiente de sacarose. Através da técnica de Western blotting foi possível observar que a proteína S6K se encontra presente em corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon, confirmado desta forma a presença da mesma no proteoma descritivo (Fig. 4.14, C).

A



Bodipy
mTOR
DAPI

B



C

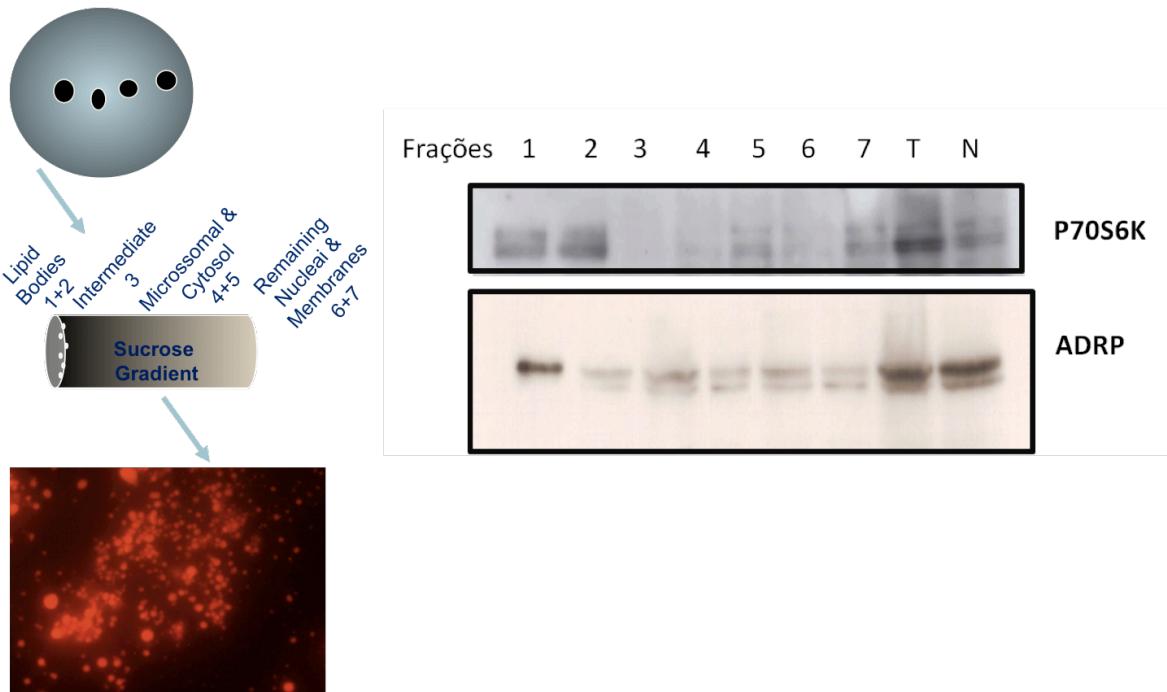


Figura 4.14 – Análise da localização subcelular de mTOR e P70S6K em células de adenocarcinoma de cólon. As células CACO-2 foram submetidas ao fracionamento subcelular por gradiente de sacarose. Para isolamento de corpúsculos lipídicos foi utilizado um tampão específico (TEE), sendo sempre entre 30×10^6 células por gradiente. Posteriormente as células foram cavitadas em nitrogênio a 700 psi por 15 minutos a 4°C, utilizando inibidores de protease. O gradiente de sacarose (em tampão TEE) em tubo de ultracentrífuga foi ultracentrifugado em rotor swing bucket a 150.000 x g por 70 minutos a 4°C. Posteriormente foi dosado LDH de todas as frações. (A) Imunomarcação por microscopia confocal mostrando a localização subcelular de mTOR e corpúsculos lipídicos em células de adenocarcinoma de cólon. Em vermelho: mTOR/ Em verde: Bodipy/ Em azul: núcleo corado com DAPI. Aumento de 100X. (B) Imunomarcação por microscopia confocal mostrando a localização subcelular de mTOR e corpúsculos lipídicos em células de adenocarcinoma de cólon. Em vermelho: mTOR/ Em verde: Bodipy/ Em azul: núcleo corado com DAPI. Bar, 10µm. (C) Expressão de S6K e ADRP de frações subcelulares obtidas através da ultracentrifugação por gradiente de sacarose obtidos de células de adenocarcinoma de cólon.

5. DISCUSSÃO

A obesidade é definida pela organização mundial de saúde (OMS) como uma condição de acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo, causada pelo desbalanço no gasto energético e ganho de peso, de tal forma que há danos à saúde do indivíduo. Estudos epidemiológicos recentes mostram um grande aumento na prevalência da obesidade na população mundial, se tornando um grave problema de saúde pública. Até o presente, mais de um bilhão de pessoas estão acima do peso, onde mais de 300 milhões são classificadas como obesas. A obesidade é um importante fator de risco para o desenvolvimento de várias doenças crônicas, como hipertensão, dislipidemia, resistência à insulina, diabetes mellitus e vários tipos de câncer (RAHMOUNI *et al.*, 2005; RAVUSSIN e SMITH, 2002; KAHN e FLIER, 2000). Os mecanismos que ligam o excesso de peso ao aumento do risco de câncer ainda não estão completamente entendidos, mas, três sistemas hormonais têm sido amplamente estudados, incluindo fatores de crescimento semelhantes à insulina, hormônios sexuais esteróides e adipocinas (RENEHAN *et al.*, 2008). Indivíduos obesos possuem um maior conteúdo de tecido adiposo, este por sua vez secreta vários fatores de crescimento e citocinas que possuem um papel essencial na inflamação crônica presente em pacientes obesos. Os níveis de leptina são proporcionais ao conteúdo de tecido adiposo e se encontram elevados em pacientes obesos (VENDRELL *et al.*, 2004). Apesar de existirem muitos estudos epidemiológicos relacionando a obesidade e o risco aumentado de câncer, necessita-se de mais estudos acerca dos eventos celulares e moleculares envolvendo o papel de adipocitocinas na sinalização celular e desenvolvimento de câncer.

A leptina é uma hormônio/citocina de 16 kDa secretada pelos adipócitos envolvida no controle do apetite e metabolismo energético através de seus efeitos sobre o hipotálamo. Este hormônio é ainda produzido em pequenas quantidades pela mucosa gástrica, epitélio mamário, miócitos esqueléticos e também pela placenta (HOWARD *et al.*, 2010). No estado não-obeso, altos níveis de leptina resultam em diminuição do apetite através de alterações neuroendócrinas, mas durante a obesidade existe o estabelecimento de níveis plasmáticos elevados deste hormônio em função de uma resistência hipotalâmica (HURSTING *et al.*, 2009). Tanto que animais que apresentam mutações no gene que codifica a leptina (Ob/Ob) ou no gene do receptor de leptina (Db/Db) exibem fenótipos obesos e são utilizados em muitos estudos como modelos de obesidade animal (TILG e MOSCHEN, 2006). A leptina é considerada uma citocina pró-inflamatória como por exemplo, IL-6 e IL-12. Inicialmente, os estudos de leptina focavam

em seus efeitos na redução de peso e no eixo leptina/receptor de leptina para o desenvolvimento de drogas a fim de tratar a obesidade. Porém, a simples administração de leptina não diminui completamente o ganho de peso, pois ocorre resistência a esta adipocina em grande parte dos humanos obesos. Entretanto, tem se estudado o papel desta adipocina nos efeitos diretos na periferia como no sistema imune e também no metabolismo de ácidos graxos. Trabalhos recentes demonstraram o efeito da leptina no metabolismo e sinalização celular em linhagens de células sanguíneas, pancreáticas, musculares e também em adipócitos (BJORBAEK e KAHN, 2004). Em relação ao estoque de lipídeos e metabolismo, a leptina parece ter um papel distinto de acordo com o tipo de tecido. Nos rins de camundongos deficientes para o receptor de leptina (*db/db*), há um aumento do acúmulo de lipídeos e expressão de ADRP (O'ROURKE, 2009). De forma interessante, pesquisadores do nosso grupo demonstraram que a leptina é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008). A leptina também é capaz de ativar a Src cinase e PI3K em células de câncer de cólon e promover a invasão das células epiteliais através da ativação das vias PI3K-Rho-Rac (JAFFE e SCHWARTZ, 2008; ATTOUB *et al.*, 2000). Recentemente, Wang e colaboradores demostraram que o receptor de leptina está presente em amostras de tecidos de carcinoma do cólon e se correlaciona com a gravidade do tumor e que a ativação de mTOR por leptina induz a proliferação da linhagem de carcinoma de cólon HTC-116 (WANG *et al.*, 2012). Baseado nesses dados, este trabalho teve por objetivo estudar o papel da leptina no metabolismo lipídico e proliferação celular, avaliando *in vitro* a regulação de corpúsculos lipídicos e da via de mTOR na transformação celular. Para estudo do efeito da leptina na formação de corpúsculos lipídicos em tecidos periféricos como o intestino, foi avaliado neste trabalho um estímulo que favorece a biogênese destas organelas em células epiteliais intestinais *in vitro*. Assim, este trabalho visa demonstrar a relação de vias de sinalização ativadas por esta adipocina e sua relação com a progressão tumoral e alteração do metabolismo lipídico em células epiteliais intestinais, bem como sua participação na ativação celular e produção de mediadores inflamatórios.

Para as análises do papel da leptina na modulação da atividade celular, utilizou-se doses e tempos variados de estímulo com este hormônio. Os resultados mostraram que a leptina foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais. Mais ainda, para o estudo do papel de mTOR nesta modulação, utilizou-se um inibidor do complexo mTORC1 (rapamicina). Foi observado que a rapamicina inibiu

significativamente a formação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais estimuladas por leptina em 6 horas. Um ponto curioso deste estudo foi a observação de imagens de corpúsculos lipídicos de células epiteliais estimuladas com leptina 6 horas após o estímulo, onde estes corpúsculos se apresentavam não só em maior número, mas também com tamanho maior que quando comparados aos grupos controle e tratado.

Em conjunto, os dados sugerem uma relevante e importante participação de mTOR nos mecanismos que levam ao acúmulo intracelular de lipídios em células do epitélio intestinal estimuladas por leptina. O complexo mTORC1 possui dois substratos bem estabelecidos, S6K1 e 4EBP1, que controlam aspectos da tradução de proteínas. Após ativação, mTORC1 é recrutado para o complexo eIF3, onde fosforila diretamente S6K1, para o aumento da tradução (FOSTER e FINGAR, 2010). De maneira interessante, os resultados mostraram que a estimulação de células epiteliais intestinais com leptina altera significativamente os níveis de fosforilação de P70S6K, indicando a participação de mTOR na ativação de células epiteliais ocasionada pela leptina. A caracterização da função da leptina na regulação do metabolismo de lipídios, produção de mediadores inflamatórios e na biogênese de corpúsculos lipídicos em células epiteliais é importante para a compreensão do seu papel na patogênese do adenocarcinoma do cólon e outros tumores relacionados com a obesidade.

A leptina exerce um importante papel tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa, sendo o receptor de leptina expresso em uma variedade de células do sistema imune (GUZIK *et al.*, 2006). Este hormônio é um potente indutor da quimiotaxia de neutrófilos e monócitos (CURAT *et al.*, 2004). Em neutrófilos, a leptina estimula a produção de citocinas como IL-6, TNF- α , CCL2 e VEGF (TILG e MOSCHEN, 2006). De maneira interessante, nossos resultados demonstraram que a leptina é capaz de induzir um aumento da produção de CINC-1, uma proteína quimiotática para neutrófilos em ratos, no período de 6 horas de estímulo. Logo, a produção de CINC-1 por células epiteliais intestinais pode contribuir para o recrutamento de neutrófilos para este tecido. Os neutrófilos poderão participar na produção citocinas importantes na constituição de um microambiente inflamatório, que contribuem na progressão tumoral (BAYNE *et al.*, 2012). O trabalho de Tian e colaboradores demonstrou a capacidade da leptina em induzir a quimiotaxia de neutrófilos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por estas células, sendo a maioria destes efeitos mediados através do receptor de forma longa (ObRb), expresso em células endoteliais e por vários leucócitos (TIAN *et al.*, 2002). A leptina induz ainda aumento da expressão de TGF- β , VEGF e bFGF

(Fator de crescimento de fibroblastos básico) e induz aumento na migração de linhagens de carcinoma de próstata (FRANKENBERRY *et al.*, 2004). De forma interessante, a leptina foi capaz de induzir aumento da síntese do mediador TGF- β em células epiteliais. Além disso, verificou-se uma importante participação de mTOR na produção de TGF- β , onde o tratamento com a rapamicina inibiu o efeito da leptina em induzir a produção deste mediador. Sendo assim, a produção destes mediadores contribui para a inflamação aguda e estabelecimento de um microambiente inflamatório importante na carcinogênese.

O receptor de leptina pertence à família de receptores de citocinas classe I. Estes possuem um domínio homólogo ao receptor de citocina na região extracelular. Existem seis isoformas do receptor e apesar das cinco isoformas curtas do receptor possuir domínio transmembrana, somente a forma longa do receptor possui os motivos intracelulares necessários para a ativação de vias de sinalização (TARTAGLIA, 1997). Assim como outros receptores de classe I de citocinas, a leptina ativa a via de JAK/STAT (AHIMA e OSEI, 2004). Estudos do nosso grupo demonstraram que a leptina é capaz de ativar a via de PI3K/mTOR em macrófagos peritoneais (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008). A via de PI3K/Akt/mTOR é ativada por fatores de crescimento, mitógenos e hormônios e um importante efeito desta ativação é a tradução de RNA mensageiro dependente de capeamento. As células de mamíferos possuem duas proteínas cinases ribossomais S6 (S6K1 e S6K2), codificadas por diferentes genes, sendo que ambas são alvos de mTOR (MAMANE *et al.*, 2006). As S6 cinases possuem um importante papel no crescimento celular, uma vez que a deleção destas resulta em animais de tamanho reduzido (PENDE *et al.*, 2004). Estudos tem demonstrado a participação de S6K1 na angiogênese, mobilidade e no potencial invasivo de tumores (SKINNER *et al.*, 2004; ZHOU e WONG, 2006). Além disso, tem sido descrito que mutações que superativam a via de PI3K /mTOR contribuem para a tumorigênese de células epiteliais, incluindo carcinoma de cólon (LIU *et al.*, 2009). A rapamicina, também chamada sirolimus, exerce seus efeitos biológicos através de sua ligação à proteína de ligação a FK-506 (FKBP12), onde este complexo se liga a mTOR e inibe a sinalização e ativação subsequente de S6K e 4E-BP (SARBASSOV *et al.*, 2005). O FK-506, também conhecido como tacrolimus, é um imunossupressor isolado de *Streptomyces tsukubaensis*, que se liga ao seu receptor citosólico, FKBP12. O complexo FK-506/FKBP liga-se à serina/treonina fosfatase calcineurina, o que inibe a translocação de NFAT para o núcleo, resultando na inibição da transcrição de IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, TNF- α e INF- γ . Esta droga é mais potente que a ciclosporina (YAMA *et al.*, 2004). Sendo a via de mTOR importante em vários tipos de tumores, avaliamos o papel

desta via na ativação de células epiteliais induzida por leptina. O inibidor de mTOR, a rapamicina, foi capaz de inibir a fosforilação de S6K induzida por leptina. Da mesma forma, o análogo da rapamicina, everolimus, foi capaz de inibir a fosforilação de S6K em células epiteliais intestinais, porém, o imunossupressor FK-506, não foi capaz de abolir este efeito. Uma vez que o FK-506 se liga a FKBP12 e não exerce efeitos sobre mTOR, utilizamos esta droga como nosso controle negativo e esta se mostrou importante para os estudos de fosforilação em células intestinais. Em suma, a leptina ativa a via de mTOR em células epiteliais intestinais, sendo esta uma via envolvida na progressão tumoral. Corroborando nossos achados, Um e colaboradores demonstraram que animais deficientes em S6K apresentam uma importante redução de tecido adiposo, devido ao aumento na lipólise, no gasto energético e redução no acúmulo de lipídios em corpúsculos lipídicos presentes em adipócitos (UM *et al.*, 2004). Uma vez que mTOR tem papel chave no metabolismo lipídico e carcinogênese, foi investigado o papel da via de mTOR na indução de corpúsculos lipídicos por leptina. Assim, documentamos pela primeira vez, que a leptina induz aumento na formação de corpúsculos lipídicos de forma dependente de mTOR em células epiteliais, pois o tratamento com os inibidores de mTOR, rapamicina e everolimus, aboliram este efeito. Logo, a via de mTOR é de grande importância para o mecanismo de indução da formação de corpúsculos lipídicos desencadeado pela leptina em células epiteliais. Temos por hipótese que o aumento do número de corpúsculos lipídicos pode ser importante na malignidade celular uma vez que contribuem para: (1) geração de substratos para a síntese de novas membranas celulares a fim de acompanhar as altas taxas de proliferação; (2) Composição e regulação de estruturas membranares que coordenam a transdução de sinal, como por exemplo lipid rafts; (3) Biossíntese de moléculas de sinalização lipídicas pró-tumorigênicas, como por exemplo as prostaglandinas e o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, que é gerado pela ação de PI3K e ativa Akt e consequentemente mTOR, promovendo proliferação celular.

Além disso, as SREBPs (proteínas reguladoras de ligação ao elemento esterol), que induzem a expressão de um grande número de genes envolvidos na síntese de novo de lipídios e na biossíntese de esterol, surgiram como os principais efetores da sinalização de mTORC1 e estimulam a lipogênese (LAPLANTE e SABATINI, 2009). Em câncer de próstata, o fenótipo alterado de colesterol foi induzido pela perda do supressor de tumor PTEN, superativação da via de PI3K/ Akt/mTOR e consequente ativação da SREBP e do receptor da LDL (lipoproteína de baixa densidade). Neste estudo, a inibição da esterificação do colesterol suprimiu significativamente a proliferação, migração,

invasão e crescimento do tumor *in vivo* (YUE *et al.*, 2014). A proliferação celular exacerbada, uma característica comum de todos os tipos de câncer, requer ácidos graxos para a síntese das membranas e também de moléculas de sinalização, sendo que a grande maioria das células armazenam ácidos graxos na forma de TAGs em corpúsculos lipídicos. Assim, os ácidos graxos são essenciais para a proliferação celular, inclusive de células tumorais, e limitar sua disponibilidade pode ser uma importante estratégia terapêutica.

As adipocinas proporcionam um elo importante entre a obesidade, resistência à insulina e inflamação. A inflamação é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de câncer, sendo que condições inflamatórias como colite e doença de Crohn predispõem ao câncer de cólon (JES *et al.*, 2005; LISA e WERB, 2002). Nosso grupo demonstrou que corpúsculos lipídicos de células do câncer de cólon são organelas dinâmicas e funcionais envolvidas centralmente na síntese de PGE₂ (ACCIOLY *et al.*, 2008). Além disso, estas organelas são descritas como sítios de localização de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas, incluindo a cPLA₂ e COX-2 em células epiteliais (ACCIOLY *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2009). No presente estudo, demonstramos que a leptina também foi capaz de induzir a expressão de COX-2 e TGF-β em células epiteliais e o pré-tratamento com o inibidor de mTOR, rapamicina, bloqueia estes efeitos, o que sugere uma importante correlação desta via com a indução de um ambiente pró-inflamatório. Já foi demonstrado que a leptina aumenta a disponibilidade de ácido araquidônico, aumenta a expressão e atividade de fosfolipase A₂ e induz a expressão de COX-2 em macrófagos alveolares (RASO *et al.*, 2002). Estudos indicam um efeito mitogênico da leptina sobre câncer gástrico (PAI *et al.*, 2005), mama (ROSE *et al.*, 2004), ovário (CHOI *et al.*, 2005), próstata (SOMASUNDAR *et al.*, 2004) e endométrio (SHARMA *et al.*, 2006). No entanto, os mecanismos envolvidos na proliferação celular induzida por leptina não são completamente compreendidos. Ogunwobi e Beales relataram que a leptina estimula a proliferação de linhagens de carcinoma de esôfago através da ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (OGUNWOBI e BEALES, 2008). Além disso, a leptina promove o crescimento, invasão e migração do hepatocarcinoma via sinalização de JAK/STAT (SAXENA *et al.*, 2007). Neste trabalho demonstramos que a leptina estimula o crescimento de células epiteliais intestinais não-transformadas, aumentando inclusive o número de células na fase S do ciclo celular. Este fenômeno é inibido por rapamicina. A inibição da formação de corpúsculos lipídicos por rapamicina se correlaciona com a inibição da geração de COX-2 e proliferação de células epiteliais. As

proteínas com funções bem estabelecidas na transformação celular oncogênica, tumorigênese, e metástase, incluindo, PI3K, proteína cinase 1 regulada por sinal extracelular (ERK1), ERK2, p38 e PKC, foram localizadas em corpúsculos lipídicos de vários tipos celulares (YU et al., 1998; YU et al., 2000; CHEN et al., 2002). Além disso, o aumento do tamanho de corpúsculos lipídicos estimula a proliferação de células de tumor de cólon, principalmente pela perda de FOXO3 (QI et al., 2013). Dados recentes indicam que a carcinogênese e angiogênese são resultado não apenas da interação de células tumorais com células endoteliais vasculares ou linfáticas, mas também com o estroma circundante e células inflamatórias (BISSELL e LABARGE, 2005), demonstrando assim a importante participação do microambiente tumoral nestes processos. Neste trabalho demonstramos uma importante participação da leptina na ativação de células epiteliais, formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores como PGE₂, TGF-β e CINC-1, contribuindo desta forma para o estabelecimento de um microambiente tumoral que favorece o processo de tumorigênese.

Os corpúsculos lipídicos interagem com outras organelas envolvidas em atividades metabólicas fundamentais para a homeostase celular, como mitocôndrias (WAN et al., 2007), retículo endoplasmático (OZEKI et al., 2005) e peroxissomos (BINNS et al., 2007). Além disso, a estrutura dessas organelas é composta por uma combinação complexa de lipídios e proteínas, que variam conforme o estímulo ou tipo celular (MURPHY, 2001; MARTIN e PARTON, 2006; BOZZA et al., 2007). Corpúsculos lipídicos estão envolvidos em funções tão diversas como metabolismo lipídico (MARTIN e PARTON, 2005; LONDOS et al., 2005), tráfego de membranas (LIU et al., 2003) e na resposta imune (BOZZA et al., 2007, 2009). Dentre as diversas funções celulares mencionadas anteriormente nas quais corpúsculos lipídicos estão implicados, é importante destacar o possível papel que estas organelas desempenham na proliferação e na transformação celular. Foi sugerido o papel de corpúsculos lipídicos no fenótipo hiperproliferativo de células tumorais de cólon (ACCIOLY et al., 2008). Em primeiro lugar, corpúsculos lipídicos apresentam em sua estrutura proteínas envolvidas na sinalização intracelular mitogênica como PI3K, MAP cinases e PKC (YU et al., 1998, 2000; CHEN et al., 2002). Em segundo lugar, as proteínas caveolina-1 e Tgl4, residentes de corpúsculos lipídicos e inicialmente relacionadas com o metabolismo de lipídios, foram apontadas como peças chave na progressão do ciclo celular em hepatócitos e leveduras, respectivamente (FERNÁNDEZ et al., 2006; KURAT et al., 2009).

A análise proteômica feita a partir de monócitos humanos (U937) detectou muitas proteínas envolvidas no metabolismo de colesterol e triglicerídeos, Rab GTPases e muitas proteínas associadas ao endoplasmático (ER). Além disso, a presença de ribossomos, muitas proteínas associadas à membrana, bem como membranas semelhante a de retículo endoplasmático e também proteínas do lúmen do retículo, indicam que o corpúsculo lipídico podem ser sítios de síntese proteica (WAN *et al.*, 2007). Esta hipótese é suportada pela demonstração de corpúsculos lipídicos exibindo acúmulo de 3H-uridina e detecção de RNA mensageiro por hibridização *in situ* (DVORAK *et al.*, 2003; DVORAK, 2005;). A análise proteômica de frações de corpúsculos lipídicos derivados de leucócitos identificou várias proteínas de subunidade ribossômica, bem como fatores de iniciação da tradução (WAN *et al.*, 2007). Além disso, proteínas ribossomais e proteínas que interagem com RNA foram também identificadas nas análises proteômicas de corpúsculos lipídicos obtidos a partir de uma linhagem de hepatoma que expressa a proteína do capsídeo do vírus da hepatite C (SATO *et al.*, 2006). Um estudo do proteoma de corpúsculos obtidos a partir de células de mamífero revelou um total de 125 proteínas (BARTZ *et al.*, 2007). Juntamente com as proteínas estruturais de corpúsculos lipídicos já conhecidas, foram identificadas várias enzimas envolvidas na síntese de lipídios e proteínas de transporte de membrana. Um fosfoproteoma de corpúsculos lipídicos isolados de células HeLa identificou 45 proteínas fosforiladas, incluindo ADRP, Rab e ATGL (BARTZ *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006). Em nossas amostras de corpúsculos lipídicos obtidos através de células de adenocarcinoma de cólon, encontramos um total de 370 proteínas, agrupadas em 295 clusters proteicos. Foram encontradas proteínas como Rab 2, Rab 5, Rab 7, Rab 10, Rab 11 e Rab 21, que podem ser classificadas como interruptores dependentes de GTP que controlam o fluxo entre compartimentos de membranas, além disso também foram identificadas proteínas da família das SNAREs, envolvidas na fusão de vesículas, como VPS e VAMP.

Os corpúsculos lipídicos também podem desempenhar um papel ativo na síntese de lipídios. Enzimas envolvidas na síntese de lipídios têm sido encontrados em corpúsculos isolados de células de mamíferos (BOZZA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010). Através de uma abordagem proteômica diferencial (iTRAQ), frações de corpúsculos isolados de células de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2, e enterócitos/TC7 que expressam ou não a proteína do núcleo do vírus da hepatite C, foram identificadas 42 proteínas, sendo 21 envolvidas no metabolismo de lipídios (BEILSTEIN *et al.*, 2013). A perilipina 1 encontra-se especificamente em corpúsculos lipídicos de adipócitos. A

perilipina-5 também conhecida como OXPAT, é expressa em células que têm uma elevada capacidade de oxidação de ácidos graxos, tais como células do músculo cardíaco. Já a perilipina 2 (ADRP) e perilipina 3 (TIP47) são ubíquas (WOLINS *et al.*, 2006). Em nosso estudo de proteômica foram encontradas proteínas estruturais de corpúsculos lipídicos, tais como ADRP/PLIN2 e TIP47/PLIN3. As enzimas envolvidas na biossíntese do colesterol têm sido rotineiramente identificadas em estudos de proteômica (HODGES *et al.*, 2010; BOUCHOUX *et al.*, 2011; BARTZ *et al.*, 2007). Vários estudos *in vitro* têm verificado tanto a presença e atividade destas enzimas em corpúsculos lipídicos (SORGER e DAUM, 2002; FUJIMOTO *et al.*, 2007; MOESSINGER *et al.*, 2011;), sugerindo que estas organelas são locais onde ocorrem alguns passos da síntese de lipídios. Neste estudo encontramos diversas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico como Acetyl-CoA acetyltransferase, Acil-CoA sintetase, lanosterol sintase, 1-acilglicerol-3-fosfatase O-aciltransferase (CGI-58), transaldolase e retinol desidrogenase. Também encontramos proteínas de citoesqueleto como tubulina, actina, vimentina, dentre outras. De forma interessante, chaperonas importantes como HSP70, HSP90, chaperonina, calnexina e Protein dissulfide isomerase (PDI), foram encontradas no proteoma de nosso estudo.

Um estudo comparou corpúsculos ricos em colesterol éster com corpúsculos ricos em TAGs utilizando espectrometria de massas em tandem. Neste estudo foram encontradas 278 proteínas em quantidades semelhantes em ambas as amostras, incluindo proteínas previamente encontradas em corpúsculos como proteínas de trânsito de membrana, anexina 2, Rab5c e proteínas estruturais Rab8a, vimentina, tubulinas alfa e beta, chaperonas HSPa8, HSPd1, GRP78, HSP70, HSP90 e, bem como ADRP e VDAC1, sendo esta última que envolvida na transferência de lipídios no interior de mitocôndrias (KHOR *et al.*, 2014). Como descrito anteriormente, foi demonstrado também nessas organelas a compartimentalização de enzimas fundamentais na liberação de AA, como cPLA2, ERK1, ERK2, p38 e p85 (YU *et al.*, 1998). Cao e colaboradores demonstram que expressão de FACL4 está aumentada em pacientes com adenocarcinoma de cólon (CAO *et al.*, 2001). Neste estudo identificamos proteínas de sinalização importantes como a FACL4, HMGB1, PAFAH, Glutationa S transferase, S100A6 (envolvida na progressão do ciclo celular), TGK1, calmodulina, ciclofilina A e anexina 1.

De forma interessante, também foram identificadas proteínas ribossomais envolvidas no processo de tradução, como a proteína S6 cinase, envolvida diretamente

neste processo, também o fator de alongamento eucariótico 1, fator de alongamento eucariótico 2, fator de iniciação da tradução eucariótico 5, L22 proteína ribossomal 60S e proteína ribossomal acida 60S (componentes da subunidade ribossomal 60S). Várias histonas também foram encontradas, como Histona 2Az, 2B, 3 e 4. Além disso, proteínas importantes envolvidas no crescimento e ciclo celular como RNA helicase DDX3X, uridina fosforilase e proteína ligante de DNA helicase 8 (CHD8) foram encontradas no proteoma de corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon. De acordo com os dados obtidos no proteoma descritivo de corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon, fizemos um mapa da rede de interações entre as proteínas encontradas. O programa string reconheceu 314 proteínas de acordo com os genes e observou 2238 interações. Dentro deste mesmo programa foram realizadas análises baseadas no banco de dados Gene Ontology para avaliar as redes de interações das proteínas de acordo com processos biológicos e funções moleculares, gerando posteriormente dois novos mapas para as interações entre as proteínas envolvidas na sinalização celular e no processo tradução.

Dentro da categoria processos biológicos, foram encontrados 62 genes de proteínas envolvidas com transporte intracelular de uma maneira geral. Também foram encontradas 37 genes de proteínas envolvidas na regulação do transporte intracelular. De maneira interessante, 8 genes de um complexo proteínas que recobrem vesículas transportadoras de proteínas do complexo de golgi para o retículo endoplasmático por exemplo foram encontrados. Quanto a proteínas envolvidas na regulação da organização do citoesqueleto, 13 genes foram identificados. Já na regulação do transporte mediado por vesículas, 11 genes estão listados. Também foram encontrados 13 genes envolvidos na regulação do transporte de proteínas.

Com relação ao processo de tradução de proteínas, 38 genes de proteínas envolvidas em reações químicas e vias envolvendo RNA mensageiro foram encontradas nesta análise. Com o processo de iniciação da tradução foram descritos 18 genes de proteínas diversas. Já com relação ao alongamento da cadeia polipeptídica e término da tradução foram encontrados 17 genes. Foram encontrados também 20 genes relacionados ao processamento de RNA. Com relação ao processo de tradução de proteínas, 42 genes de proteínas envolvidas em funções moleculares relacionadas a este processo foram encontradas e 83 interações foram observadas no total. Estas interações mostram de fato uma comunicação entre as proteínas encontradas em corpúsculos

lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon importantes tanto no contexto de processos biológicos quanto de funções moleculares, demonstrando desta forma que estas proteínas podem estar ativas nestas organelas participando de vários processos intracelulares envolvidos nos mecanismos de tumorigênese.

Juntos, estes resultados contribuem para o conhecimento atual de que mTOR é criticamente envolvida na sinalização por leptina, na ativação de células epiteliais, levando ao acúmulo de corpúsculos lipídicos, produção de mediadores inflamatórios e aumento da proliferação celular. Além disso, nosso trabalho reforça a atividade dinâmica de corpúsculos lipídicos no contexto tumoral, fornecendo informações importantes acerca do conteúdo proteico para uma investigação mais aprofundada do papel desta organela em doenças como obesidade, diabetes e câncer. Um maior conhecimento destas organelas poderá contribuir, no futuro, para o desenvolvimento de novas estratégias e terapias para o controle de neoplasias.

6. CONCLUSÕES

- Neste estudo foi demonstrada a participação de mTOR na ativação de células epiteliais por leptina *in vitro*.
- A adipocina leptina induz a ativação de células epiteliais caracterizada por aumento no número de corpúsculos lipídicos, produção de citocinas como CINC-1, TGF-β e mediadores inflamatórios como PGE₂.
- A ativação da via de mTOR é fundamental para biogênese de corpúsculos lipídicos, produção de TGF-β e expressão de COX-2 em células epiteliais estimuladas por leptina
- mTOR está envolvida na alteração do metabolismo lipídico, produção de mediadores inflamatórios e proliferação de células epiteliais.
- Os resultados sugerem que a leptina possui um importante papel nos mecanismos de transformação celular e carcinogênese, regulando a via de sinalização de mTOR envolvida na formação de corpúsculos lipídicos, produção de mediadores inflamatórios e proliferação celular.
- Os corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon contêm proteínas e enzimas envolvidas em diversos eventos celulares, evidenciando desta forma uma possível interação desta com outras organelas. Esta funciona como uma importante plataforma de sinalização, podendo ter um papel ímpar nos eventos celulares de transformação e carcinogênese.
- Os mapas das redes de interações de proteínas demonstram uma importante interligação de proteínas envolvidas nos processos de tradução e sinalização celular presentes em corpúsculos lipídicos de células de adenocarcinoma de cólon, sugerindo que estas organelas funcionam como importantes plataformas de sinalização celular e tradução de proteínas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly, M. T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C. M., Carrossini, N., Robbs, B. K., Oliveira, S. S., ... Viola, J. P. B. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Research*, 68, 1732–1740. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1999
- Ackerman, W. E., Robinson, J. M., & Kniss, D. A. (2005). Despite transcriptional and functional coordination, cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 largely reside in distinct lipid microdomains in WISH epithelial cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 53, 1391–1401. doi:10.1369/jhc.5A6710.2005
- Ahima, R. S., & Osei, S. Y. (2004). Leptin signaling. *Physiology and Behavior*. doi:10.1016/j.physbeh.2004.02.014
- Alessi, D. R., Pearce, L. R., & García-Martínez, J. M. (2009). New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Science Signaling*, 2, pe27. doi:10.1126/scisignal.267pe27
- Aloulou, N., Bastuji-Garin, S., Le Gouvello, S., Abolhassani, M., Chaumette, M. T., Charachon, A., ... Sobhani, I. (2008). Involvement of the leptin receptor in the immune response in intestinal cancer. *Cancer Research*, 68, 9413–9422. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0909
- Andersson, L., Boström, P., Ericson, J., Rutberg, M., Magnusson, B., Marchesan, D., ... Olofsson, S.-O. (2006). PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *Journal of Cell Science*, 119, 2246–2257. doi:10.1242/jcs.02941
- Andò, S., & Catalano, S. (2011). The multifactorial role of leptin in driving the breast cancer microenvironment. *Nature Reviews Endocrinology*. doi:10.1038/nrendo.2011.184
- Arend, A., Masso, R., Masso, M., & Selstam, G. (2004). Electron microscope immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and -2 in pseudopregnant rat corpus luteum during luteolysis. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 74, 1–10. doi:10.1016/j.prostaglandins.2004.05.002
- Arendt, L. M., McCready, J., Keller, P. J., Baker, D. D., Naber, S. P., Seewaldt, V., & Kuperwasser, C. (2013). Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. *Cancer Research*, 73, 6080–6093. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0926
- Arpacı, F., Yılmaz, M. I., Ozet, A., Ayta, H., Ozturk, B., Komurcu, S., & Ozata, M. (2002). Low serum leptin level in colon cancer patients without significant weight loss. *Tumori*, 88, 147–149.
- Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, Logan TF, Dutcher JP, Hudes GR, e cols. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22(5):909-18.

- Attoub, S., Noe, V., Pirola, L., Bruyneel, E., Chastre, E., Mareel, M., ... Gespach, C. (2000). Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14, 2329–2338. doi:10.1096/fj.00-0162
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, M. N., ... Lewin, M. J. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394, 790–793. doi:10.1038/29547
- Bandeira-Melo, C., Bozza, P. T., & Weller, P. F. (2002). The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. doi:10.1067/mai.2002.121529
- Bandeira-Melo, C., Herbst, a, & Weller, P. F. (2001). Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24(6), 653–7. doi:10.1165/ajrcmb.24.6.f209
- Bandeira-Melo, C., Phoofolo, M., & Weller, P. F. (2001). Extranuclear Lipid Bodies, Elicited by CCR3-mediated Signaling Pathways, Are the Sites of Chemokine-enhanced Leukotriene C4 Production in Eosinophils and Basophils. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 22779–22787. doi:10.1074/jbc.M101436200
- Bandeira-Melo, C., & Weller, P. F. (2005). Mechanisms of eosinophil cytokine release. In *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 100, pp. 73–81). doi:10.1590/S0074-02762005000900013
- Bardou, M., Barkun, A. N., & Martel, M. (2013). Obesity and colorectal cancer. *Gut*, 62(6), 933–47. doi:10.1136/gutjnl-2013-304701
- Barlow, W. E., White, E., Ballard-Barbash, R., Vacek, P. M., Titus-Ernstoff, L., Carney, P. A., ... Kerlikowske, K. (2006). Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 1204–1214. doi:10.1093/jnci/djj331
- Bartemes, K. R., McKinney, S., Gleich, G. J., & Kita, H. (1999). Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162, 2982–2989.
- Bartz, R., Zehmer, J. K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y., & Liu, P. (2007). Dynamic activity of lipid droplets: Protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *Journal of Proteome Research*, 6, 3256–3265. doi:10.1021/pr070158j
- Bayne, LJ., Beatty, GL., Jhala, N, Clark, CE., Rhim, AD., Stanger, BZ., Vonderheide, RH. (2012) Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer cell* 21(6), 822-35

- Beil, W. J., Weller, P. F., Peppercorn, M. A., Galli, S. J., & Dvorak, A. M. (1995). Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF-alpha in colonic Crohn's disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 58, 284–298.
- Berg, A. H., & Scherer, P. E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation Research*. doi:10.1161/01.RES.0000163635.62927.34
- Bickel, P. E., Tansey, J. T., & Welte, M. A. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. doi:10.1016/j.bbalip.2009.04.002
- Binns, D., Januszewski, T., Chen, Y., Hill, J., Markin, V. S., Zhao, Y., ... Goodman, J. M. (2006). An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *Journal of Cell Biology*, 173, 719–731. doi:10.1083/jcb.200511125
- Bissell, M. J., & Labarge, M. A. (2005a). Context, tissue plasticity, and cancer: Are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell*. doi:10.1016/j.ccr.2004.12.013
- Bissell, M. J., & Labarge, M. A. (2005b). Context, tissue plasticity, and cancer: Are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell*. doi:10.1016/j.ccr.2004.12.013
- Bjørbaek, C., & Kahn, B. B. (2004). Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Progress in Hormone Research*, 59, 305–331. doi:10.1210/rp.59.1.305
- Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B. R., ... Olofsson, S.-O. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nature Cell Biology*, 9, 1286–1293. doi:10.1038/ncb1648
- Boström, P., Rutberg, M., Ericsson, J., Holmdahl, P., Andersson, L., Frohman, M. A., ... Olofsson, S. O. (2005). Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25, 1945–1951. doi:10.1161/01.ATV.0000179676.41064.d4
- Bozza, P. T., Magalhães, K. G., & Weller, P. F. (2009). Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. doi:10.1016/j.bbalip.2009.01.005
- Bozza, P. T., Melo, R. C. N., & Bandeira-Melo, C. (2007). Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(1), 30–49. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.06.006
- Bozza, P. T., Payne, J. L., Goulet, J. L., & Weller, P. F. (1996). Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *The Journal of Experimental Medicine*, 183, 1515–1525. doi:10.1084/jem.183.4.1515

Bozza, P. T., Payne, J. L., Morham, S. G., Langenbach, R., Smithies, O., & Weller, P. F. (1996). Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 11091–11096. doi:10.1073/pnas.93.20.11091

Bozza, P. T., & Viola, J. P. B. (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 82, 243–50. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.005

Bozza, P. T., Yu, W., Cassara, J., & Weller, P. F. (1998). Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *Journal of Leukocyte Biology*, 64, 563–569.

Bozza, P. T., Yu, W., Penrose, J. F., Morgan, E. S., Dvorak, A. M., & Weller, P. F. (1997). Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 909–920. doi:10.1084/jem.186.6.909

Brasaemle, D. L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of Lipid Research*, 48, 2547–2559. doi:10.1194/jlr.R700014-JLR200

Brasaemle, D. L., Dolios, G., Shapiro, L., & Wang, R. (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 46835–46842. doi:10.1074/jbc.M409340200

Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., & Thun, M. J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England Journal of Medicine*, 348, 1625–1638. doi:10.1056/NEJMoa021423

Cao, Y., Dave, KB., Doan, TP., Prescott, SM (2001) Fatty Acid CoA Ligase 4 Is Up-Regulated in Colon Adenocarcinoma. *Cancer research* 61, 8429–8434

Carbone, F., La Rocca, C., & Matarese, G. (2012). Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie*. doi:10.1016/j.biochi.2012.05.018

Chang, B. H.-J., Li, L., Paul, A., Taniguchi, S., Nannegari, V., Heird, W. C., & Chan, L. (2006). Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 1063–1076. doi:10.1128/MCB.26.3.1063-1076.2006

Chatterjee, T. K., Stoll, L. L., Denning, G. M., Harrelson, A., Blomkalns, A. L., Idelman, G., ... Weintraub, N. L. (2009). Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: Influence of high-fat feeding. *Circulation Research*, 104, 541–549. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182998

Chen, C., Chang, Y. C., Lan, M. S., & Breslin, M. (2013). Leptin stimulates ovarian cancer cell growth and inhibits apoptosis by increasing cyclin D1 and Mcl-1 expression via the activation of the MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways. *International Journal of Oncology*, 42, 1113–1119. doi:10.3892/ijo.2013.1789

Chen, J. S., Greenberg, A. S., & Wang, S. M. (2002a). Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry*, 86, 784–791. doi:10.1002/jcb.10266

Chen, J. S., Greenberg, A. S., & Wang, S. M. (2002b). Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry*, 86, 784–791. doi:10.1002/jcb.10266

Choi, J.-H., Park, S.-H., Leung, P. C. K., & Choi, K.-C. (2005). Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90, 207–210. doi:10.1210/jc.2004-0297

Cirillo, D., Rachiglio, A. M., La Montagna, R., Giordano, A., & Normanno, N. (2008). Leptin signaling in breast cancer: An overview. *Journal of Cellular Biochemistry*. doi:10.1002/jcb.21911

Cook, K. S., Min, H. Y., Johnson, D., Chaplinsky, R. J., Flier, J. S., Hunt, C. R., & Spiegelman, B. M. (1987). Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science (New York, N.Y.)*, 237, 402–405. doi:10.1126/science.3299705

Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A. B., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science (New York, N.Y.)*, 312, 927–930. doi:10.1126/science.1124147

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*. doi:10.1038/nature01322

Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., & Bouloumié, A. (2004). From Blood Monocytes to Adipose Tissue-Resident Macrophages: Induction of Diapedesis by Human Mature Adipocytes. *Diabetes*, 53, 1285–1292. doi:10.2337/diabetes.53.5.1285

D'Avila, H., Melo, R. C. N., Parreira, G. G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, P. T. (2006a). Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176, 3087–3097. doi:176/5/3087 [pii]

D'Avila, H., Melo, R. C. N., Parreira, G. G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, P. T. (2006b). Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176, 3087–3097. doi:176/5/3087 [pii]

Dalamaga, M., Chou, S. H., Shields, K., Papageorgiou, P., Polyzos, S. A., & Mantzoros, C. S. (2013). Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: Current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metabolism*. doi:10.1016/j.cmet.2013.05.010

Das, U. N. (2010). Obesity: Genes, brain, gut, and environment. *Nutrition*. doi:10.1016/j.nut.2009.09.020

DiDonato, D., & Brasaemle, D. L. (2003). Fixation Methods for the Study of Lipid Droplets by Immunofluorescence Microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 51, 773–780. Retrieved from <http://www.jhc.org/cgi/content/abstract/51/6/773> or <http://www.jhc.org/cgi/content/full/51/6/773>

Dos, D. S., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., ... Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology*, 14, 1296–1302. doi:10.1016/j.cub.2004.06.054

Dowling, R. J. O., Topisirovic, I., Alain, T., Bidinosti, M., Fonseca, B. D., Petroulakis, E., ... Sonenberg, N. (2010). mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science (New York, N.Y.)*, 328, 1172–1176. doi:10.1126/science.1187532

Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., ... Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular Cell*, 39, 171–183. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022

Dvorak, A. M., McLeod, R. S., Onderdonk, A. B., Monahan-Earley, R. A., Cullen, J. B., Antonioli, D. A., ... Cisneros, R. L. (1992). Human gut mucosal mast cells: ultrastructural observations and anatomic variation in mast cell-nerve associations in vivo. *International Archives of Allergy and Immunology*, 98, 158–168. doi:10.1159/000236180

Dvoràk, A. M., Morgan, E. S., Tzizik, D. M., & Weller, P. F. (1994). Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblasts. *International Archives of Allergy and Immunology*, 105, 245–250. doi:10.1159/000236764

Dvorak, A. M., Morgan, E. S., & Weller, P. F. (2001). Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor to lipid bodies and secretory granules in human mast cells. *Histochemical Journal*, 33, 397–402. doi:10.1023/A:1013771827069

Dvorak, A. M., Morgan, E. S., & Weller, P. F. (2003). RNA is closely associated with human mast cell lipid bodies. *Histology and Histopathology*.

Dvorak, A. M., Morgan, E., Schleimer, R. P., Ryeom, S. W., Lichtenstein, L. M., & Weller, P. F. (1992). Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 40, 759–769. doi:10.1177/40.6.1316915

Dvorak, A. M., Weller, P. F., Harvey, V. S., Morgan, E. S., & Dvorak, H. F. (1993). Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)

to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *International Archives of Allergy and Immunology*, 101, 136–142. doi:10.1159/000236511

Endo, H., Hosono, K., Uchiyama, T., Sakai, E., Sugiyama, M., Takahashi, H., ... Nakajima, A. (2011). Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut*, 60(10), 1363–71. doi:10.1136/gut.2010.235754

Faivre, S., Kroemer, G., & Raymond, E. (2006). Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5, 671–688. doi:10.1038/nrd2062

Fei, W., Shui, G., Gaeta, B., Du, X., Kuerschner, L., Li, P., ... Yang, H. (2008). Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *Journal of Cell Biology*, 180, 473–482. doi:10.1083/jcb.200711136

Fernández, M. A., Albor, C., Ingelmo-Torres, M., Nixon, S. J., Ferguson, C., Kurzchalia, T., ... Pol, A. (2006). Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 313, 1628–1632. doi:10.1126/science.1130773

Fiorio, E., Mercanti, A., Terrasi, M., Micciolo, R., Remo, A., Auriemma, A., ... Surmacz, E. (2008). Leptin/HER2 crosstalk in breast cancer: in vitro study and preliminary in vivo analysis. *BMC Cancer*, 8, 305. doi:10.1186/1471-2407-8-305

Franke, W. W., Hergt, M., & Grund, C. (1987). Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: Formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell*, 49(1), 131–141. doi:10.1016/0092-8674(87)90763-X

Franke, W. W., Hergt, M., & Grund, C. (1987). Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell*, 49, 131–141. doi:10.1016/0092-8674(87)90763-X

Frankenberry, K. A., Somasundar, P., McFadden, D. W., & Vona-Davis, L. C. (2004). Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells. *American Journal of Surgery*, 188, 560–565. doi:10.1016/j.amjsurg.2004.07.031

Fried, S. K., Bunkin, D. A., & Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83, 847–850. doi:10.1210/jc.83.3.847

Friendship, B., Shan, Z., & Bridge, G. (2009). Overexpression of leptin and leptin receptors in breast cancer, 122(2005), 3078–3081. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.24.031

Gainsford, T., Willson, T. A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., ... Hilton, D. J. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14564–14568. doi:10.1073/pnas.93.25.14564

Garofalo, C., & Surmacz, E. (2006). Leptin and cancer. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.20472

Gibson, W. T., Farooqi, I. S., Moreau, M., DePaoli, A. M., Lawrence, E., O'Rahilly, S., & Trussell, R. A. (2004). Congenital leptin deficiency due to homozygosity for the Δ133G mutation: Report of another case and evaluation of response to four years of leptin therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89, 4821–4826. doi:10.1210/jc.2004-0376

Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *Journal of Cell Biology*, 100, 965–973. doi:10.1083/jcb.100.3.965

Gubern, A., Barceló-Torns, M., Barneda, D., López, J. M., Masgrau, R., Picatoste, F., ... Claro, E. (2009). JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 32359–32369. doi:10.1074/jbc.M109.061515

Gubern, A., Casas, J., Barceló-Torns, M., Barneda, D., De La Rosa, X., Masgrau, R., ... Claro, E. (2008). Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 27369–27382. doi:10.1074/jbc.M800696200

Gunter, M. J., & Leitzmann, M. F. (2006). Obesity and colorectal cancer: Epidemiology, mechanisms and candidate genes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.06.011

Guzik, T. J., Mangalat, D., & Korbut, R. (2006). Adipocytokines - Novel link between inflammation and vascular function? *Journal of Physiology and Pharmacology*. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04905.

Hashmi, S., Wang, Y., Suman, DS., Parhar, RS., Collison, K., Conca, W., Al-Mohanna, F., Gaugler, R. (2015). Human cancer: Is it linked to dysfunctional lipid metabolism? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850, 352-364.

Healy, L. A., Howard, J. M., Ryan, A. M., Beddy, P., Mehigan, B., Stephens, R., & Reynolds, J. V. (2012). Metabolic syndrome and leptin are associated with adverse pathological features in male colorectal cancer patients. *Colorectal Disease*, 14, 157–165. doi:10.1111/j.1463-1318.2011.02562.x

Hong, W. (2005). SNAREs and traffic. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.03.014

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259, 87–91. doi:10.1126/science.7678183

Howard, J. K., Lord, G. M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M. A., Ritter, M. A., ... Bloom, S. R. (1999). Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 1051–1059. doi:10.1172/JCI6762

- Howard, J. M., Pidgeon, G. P., & Reynolds, J. V. (2010a). Leptin and gastro-intestinal malignancies. *Obesity Reviews*. doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00718.x
- Howard, J. M., Pidgeon, G. P., & Reynolds, J. V. (2010b). Leptin and gastro-intestinal malignancies. *Obesity Reviews*. doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00718.x
- Hu, E., Liang, P., & Spiegelman, B. M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 10697–10703. doi:10.1074/jbc.271.18.10697
- Hursting, S. D., Smith, S. M., Lashinger, L. M., Harvey, A. E., & Perkins, S. N. (2009a). Calories and carcinogenesis: Lessons learned from 30 years of calorie restriction research. *Carcinogenesis*. doi:10.1093/carcin/bgp280
- Hursting, S. D., Smith, S. M., Lashinger, L. M., Harvey, A. E., & Perkins, S. N. (2009b). Calories and carcinogenesis: Lessons learned from 30 years of calorie restriction research. *Carcinogenesis*. doi:10.1093/carcin/bgp280
- Hwang, J. J., Chan, J. L., Ntali, G., Malkova, D., & Mantzoros, C. S. (2008). Leptin does not directly regulate the pancreatic hormones amylin and pancreatic polypeptide. *Diabetes Care*, 31, 945–951. doi:10.2337/dc07-2433
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115, 577–590. doi:10.1016/S0092-8674(03)00929-2
- Jaffe, T., & Schwartz, B. (2008). Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *International Journal of Cancer*, 123, 2543–2556. doi:10.1002/ijc.23821
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 631–643. doi:10.1038/nrm2002
- Jess, T., Gamborg, M., Matzen, P., Munkholm, P., & Sorensen, T. I. (2005). Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol*, 100, 2724–2729. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.00287.x
- Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S., & Mantzoros, C. S. (2010). Narrative review: The role of leptin in human physiology: Emerging clinical applications. *Annals of Internal Medicine*. doi:10.1059/0003-4819-152-2-201001190-00008
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2014). Adipose Tissue as an Endocrine Organ, 89(November), 2548–2556. doi:10.1210/jc.2004-0395
- Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Roddam, A., Dorgan, J. F., Longcope, C., ... Miller, S. R. (2003). Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1218–1226.
- Khandekar, M. J., Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2011). Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews Cancer*. doi:10.1038/nrc3174

Koda, M., Sulkowska, M., Wincewicz, A., Kanczuga-Koda, L., Musiatowicz, B., Szymanska, M., & Sulkowski, S. (2007). Expression of leptin, leptin receptor, and hypoxia-inducible factor 1 alpha in human endometrial cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1095, 90–98. doi:10.1196/annals.1397.013

Kuhajda, F. P. (2006). Fatty acid synthase and cancer: New application of an old pathway. *Cancer Research*. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4673

Kurat, C. F., Wolinski, H., Petschnigg, J., Kaluarachchi, S., Andrews, B., Natter, K., & Kohlwein, S. D. (2009). Cdk1/Cdc28-Dependent Activation of the Major Triacylglycerol Lipase Tgl4 in Yeast Links Lipolysis to Cell-Cycle Progression. *Molecular Cell*, 33, 53–63. doi:10.1016/j.molcel.2008.12.019

Kurokawa, Y., Matoba, R., Nakamori, S., Takemasa, I., Nagano, H., Dono, K., ... Kato, K. (2004). PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 23, 135–141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15149162>

La Cava, A., & Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4, 371–379. doi:10.1038/nri1350

Lago F, Gomez R, Gomez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 2009;34(10):500-10.

Lamming, D. W., & Sabatini, D. M. (2013). A central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metabolism*. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.002

Lang K, Ratke J. Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. *Cell Commun Signal* 2009;7:27.

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). An Emerging Role of mTOR in Lipid Biosynthesis. *Current Biology*. doi:10.1016/j.cub.2009.09.058

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). MTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of Cell Science*, 126, 1713–9. doi:10.1242/jcs.125773

Larsen, MR., Trelle, MB., Thingholm, TE., Jensen, ON. (2006). Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *BioTechniques*, 40, 790-798

Leung, J. K., Cases, S., & Vu, T. H. (2008). P311 functions in an alternative pathway of lipid accumulation that is induced by retinoic acid. *Journal of Cell Science*, 121, 2751–2758. doi:10.1242/jcs.027151

Li, D., Morris, J. S., Liu, J., Hassan, M. M., Day, R. S., Bondy, M. L., & Abbruzzese, J. L. (2009). Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with

pancreatic cancer. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 301, 2553–2562. doi:10.1001/jama.2009.886

Lichtman, M. A. (2010). Obesity and the risk for a hematological malignancy: leukemia, lymphoma, or myeloma. *The Oncologist*, 15, 1083–1101. doi:10.1634/theoncologist.2010-0206

Lim, K. G., Wan, H. C., Bozza, P. T., Resnick, M. B., Wong, D. T., Cruikshank, W. W., ... Weller, P. F. (1996). Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156, 2566–2570.

Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A., & Davis, R. J. (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*, 72, 269–278. doi:10.1016/0092-8674(93)90666-E

Liu, P., Bartz, R., Zehmer, J. K., Ying, Y. shu, Zhu, M., Serrero, G., & Anderson, R. G. W. (2007). Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773, 784–793. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.02.004

Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8, 627–644. doi:10.1038/nrd2926

Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D. I., Zhu, M., & Anderson, R. G. W. (2004). Chinese Hamster Ovary K2 Cell Lipid Droplets Appear to be Metabolic Organelles Involved in Membrane Traffic. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 3787–3792. doi:10.1074/jbc.M311945200

Löfdahl, H. E., Lane, A., Lu, Y., Lagergren, P., Harvey, R. F., Blazeby, J. M., & Lagergren, J. (2011). Increased population prevalence of reflux and obesity in the United Kingdom compared with Sweden: a potential explanation for the difference in incidence of esophageal adenocarcinoma. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 23, 128–132. doi:10.1097/MED.0b013e3283424e25

Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., ... Diehl, A. M. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12, 57–65.

Luo, Z., Saha, A. K., Xiang, X., & Ruderman, N. B. (2005). AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. doi:10.1016/j.tips.2004.12.011

MacInnis, R. J., & English, D. R. (2006). Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Cancer Causes & Control : CCC*, 17, 989–1003. doi:10.1007/s10552-006-0049-z

Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., & Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor,

apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221, 286–289. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.023

Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., & Sonenberg, N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene*, 25, 6416–6422. doi:10.1038/sj.onc.1209888

Mancuso, P., Gottschalk, A., Phare, S. M., Peters-Golden, M., Lukacs, N. W., & Huffnagle, G. B. (2002). Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168, 4018–4024.

Martin, S., Driessen, K., Nixon, S. J., Zerial, M., & Parton, R. G. (2005a). Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: Effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 42325–42335. doi:10.1074/jbc.M506651200

Martin, S., Driessen, K., Nixon, S. J., Zerial, M., & Parton, R. G. (2005b). Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42325–35. doi:10.1074/jbc.M506651200

Martin, S., & Parton, R. G. (2006). a dynamic organelle, 7(May), 373–378.

Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., ... Nakao, K. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine*, 3, 1029–1033. doi:10.1038/nm0997-1029

Matsubara, J., Honda, K., Ono, M., Sekine, S., Tanaka, Y., Kobayashi, M., ... Yamada, T. (2011). Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 20, 2195–2203. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0400

Maya-Monteiro, C. M., Almeida, P. E., D'Ávila, H., Martins, A. S., Rezende, A. P., Castro-Faria-Neto, H., & Bozza, P. T. (2008a). Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 2203–2210. doi:10.1074/jbc.M706706200

Maya-Monteiro, C. M., Almeida, P. E., D'Ávila, H., Martins, A. S., Rezende, A. P., Castro-Faria-Neto, H., & Bozza, P. T. (2008b). Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 2203–2210. doi:10.1074/jbc.M706706200

Melo, R. C. N., Ávila, H. D., Fabrino, D. L., Almeida, P. E., & Bozza, P. T. (2003a). Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: Putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue and Cell*, 35, 59–67. doi:10.1016/S0040-8166(02)00105-2

Melo, R. C. N., Ávila, H. D., Fabrino, D. L., Almeida, P. E., & Bozza, P. T. (2003b). Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: Putative intracellular

domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue and Cell*, 35, 59–67. doi:10.1016/S0040-8166(02)00105-2

Melo, R. C. N., Fabrino, D. L., Dias, F. F., & Parreira, G. G. (2006). Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflammation Research*, 55, 342–348. doi:10.1007/s00011-006-5205-0

Mesquita-Santos, F. P., Vieira-de-Abreu, A., Calheiros, A. S., Figueiredo, I. H., Castro-Faria-Neto, H. C., Weller, P. F., ... Bandeira-Melo, C. (2006). Cutting edge: prostaglandin D2 enhances leukotriene C4 synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176, 1326–1330. doi:176/3/1326 [pii]

Metlakunta, A. S., Sahu, M., & Sahu, A. (2008). Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase pathway of leptin signaling is impaired during the development of diet-induced obesity in FVB/N mice. *Endocrinology*, 149, 1121–1128. doi:10.1210/en.2007-1307

Miyoshi, Y., Funahashi, T., Tanaka, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., Shimomura, I., & Noguchi, S. (2006). High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels. *Int J Cancer*, 118, 1414–1419. doi:10.1002/ijc.21543

Morash, B., Li, A., Murphy, P. R., Wilkinson, M., & Ur, E. (1999). Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*, 140, 5995–5998.

Moreira, L. S., Piva, B., Gentile, L. B., Mesquita-Santos, F. P., D'Avila, H., Maya-Monteiro, C. M., ... Diaz, B. L. (2009). Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791, 156–165. doi:10.1016/j.bbalip.2009.01.003

Moritani, S., Ichihara, S., Hasegawa, M., Endo, T., Oiwa, M., Shiraiwa, M., ... Kato, A. (2011). Intracytoplasmic lipid accumulation in apocrine carcinoma of the breast evaluated with adipophilin immunoreactivity: a possible link between apocrine carcinoma and lipid-rich carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 35, 861–867. doi:10.1097/PAS.0b013e31821a7f3e

Murphy, D. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research*, 40(5), 325–438. doi:10.1016/S0163-7827(01)00013-3

Murphy, D. J., & Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/S0968-0004(98)01349-8

Murphy, S., Martin, S., & Parton, R. G. (2009). Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. doi:10.1016/j.bbalip.2008.07.004

Nesvizhskii, AL., Keller, A., Kolker, E., Aebersold., R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 75, 4646–58.

- Nishino, N., Tamori, Y., Tateya, S., Kawaguchi, T., Shibakusa, T., Mizunoya, W., ... Kasuga, M. (2008). FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *Journal of Clinical Investigation*, 118, 2808–2821. doi:10.1172/JCI34090
- Niu, J., Jiang, L., Guo, W., Shao, L., Liu, Y., & Wang, L. (2013). The Association between Leptin Level and Breast Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8. doi:10.1371/journal.pone.0067349
- O'Rourke, R. W. (2009). Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery*, 145(3), 255–9. doi:10.1016/j.surg.2008.08.038
- Ogunwobi, O. O., & Beales, I. L. P. (2007). The anti-apoptotic and growth stimulatory actions of leptin in human colon cancer cells involves activation of JNK mitogen activated protein kinase, JAK2 and PI3 kinase/Akt. *International Journal of Colorectal Disease*, 22, 401–409. doi:10.1007/s00384-006-0181-y
- Ogunwobi, O. O., & Beales, I. L. P. (2008). Leptin stimulates the proliferation of human oesophageal adenocarcinoma cells via HB-EGF and Tgfalpha mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *British Journal of Biomedical Science*, 65, 121–127.
- Okabayashi, K., Ashrafi, H., Hasegawa, H., Yoo, J.-H., Patel, V. M., Harling, L., ... Athanasiou, T. (2012). Body mass index category as a risk factor for colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 107, 1175–85; quiz 1186. doi:10.1038/ajg.2012.180
- O'Rourke RW. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery* 2009;145(3):255-9.
- Ostler, D. A., Prieto, V. G., Reed, J. A., Deavers, M. T., Lazar, A. J., & Ivan, D. (2010). Adipophilin expression in sebaceous tumors and other cutaneous lesions with clear cell histology: an immunohistochemical study of 117 cases. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23, 567–573. doi:10.1038/modpathol.2010.1
- Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., & Walsh, K. (2003). Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Current Opinion in Lipidology*, 14, 561–566. doi:10.1097/00041433-200312000-00003
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews. Immunology*, 11, 85–97. doi:10.1038/nri2921
- Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H., & Fujimoto, T. (2005). Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *Journal of Cell Science*, 118, 2601–2611. doi:10.1242/jcs.02401
- Pacheco, P., Bozza, F. A., Gomes, R. N., Bozza, M., Weller, P. F., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, P. T. (2002b). Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169, 6498–6506.

Pacheco, P., Vieira-de-Abreu, a., Gomes, R. N., Barbosa-Lima, G., Wermelinger, L. B., Maya-Monteiro, C. M., ... Bozza, P. T. (2007). Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 Controls Microtubule-Driven Biogenesis and Leukotriene B4-Synthesizing Function of Macrophage Lipid Bodies Elicited by Innate Immune Response. *The Journal of Immunology*, 179(12), 8500–8508. doi:10.4049/jimmunol.179.12.8500

Pai, R., Lin, C., Tran, T., & Tarnawski, A. (2005). Leptin activates STAT and ERK2 pathways and induces gastric cancer cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331, 984–992. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.236

Papathanassoglou, E., El-Haschimi, K., Li, X. C., Matarese, G., Strom, T., & Mantzoros, C. (2006). Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176, 7745–7752. doi:10.4049/jimmunol.176.12.7745

Parekh, N., Chandran, U., & Bandera, E. V. (2012). Obesity in Cancer Survival. *Annual Review of Nutrition*. doi:10.1146/annurev-nutr-071811-150713

Park, J., Kusminski, C. M., Chua, S. C., & Scherer, P. E. (2010). Leptin receptor signaling supports cancer cell metabolism through suppression of mitochondrial respiration in vivo. *The American Journal of Pathology*, 177, 3133–3144. doi:10.2353/ajpath.2010.100595

Park, J., Morley, T. S., Kim, M., Clegg, D. J., & Scherer, P. E. (2014). Obesity and cancer-mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nature Reviews Endocrinology*, 10, 455–65. doi:10.1038/nrendo.2014.94

Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., ... Thomas, G. (2004). S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 3112–3124. doi:10.1128/MCB.24.8.3112-3124.2004

Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., ... Sabatini, D. M. (2009a). DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell*, 137, 873–886. doi:10.1016/j.cell.2009.03.046

Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., ... Sabatini, D. M. (2009b). DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell*, 137, 873–886. doi:10.1016/j.cell.2009.03.046

Pol, A., Martin, S., Fernandez, M. A., Ferguson, C., Carozzi, A., Luetterforst, R., ... Parton, R. G. (2004). Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 99–110. doi:10.1091/mbc.E03-06-0368

Procaccini, C., Jirillo, E., & Matarese, G. (2012). Leptin as an immunomodulator. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 33, pp. 35–45). doi:10.1016/j.mam.2011.10.012

Procaccini, C., Pucino, V., De Rosa, V. D., Marone, G., & Matarese, G. (2014). Neuroendocrine networks controlling immune system in health and disease. *Frontiers in Immunology*. doi:10.3389/fimmu.2014.00143

Ptak, A., Kolaczkowska, E., & Gregoraszczuk, E. L. (2013). Leptin stimulation of cell cycle and inhibition of apoptosis gene and protein expression in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Endocrine*, 43, 394–403. doi:10.1007/s12020-012-9788-7

Puri, V., Konda, S., Ranjit, S., Aouadi, M., Chawla, A., Chouinard, M., ... Czech, M. P. (2007). Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 34213–34218. doi:10.1074/jbc.M707404200

Qi, W., Fitchev, P. S., Cornwell, M. L., Greenberg, J., Cabe, M., Weber, C. R., ... Savkovic, S. D. (2013). FOXO3 growth inhibition of colonic cells is dependent on intraepithelial lipid droplet density. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 16274–16281. doi:10.1074/jbc.M113.470617

Rae, F. K., Stephenson, S. A., Nicol, D. L., & Clements, J. A. (2000). Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *International Journal of Cancer*, 88, 726–732. doi:10.1002/1097-0215(20001201)88:5<726::AID-IJC7>3.0.CO;2-H

Raso, G. M., Pacilio, M., Esposito, E., Coppola, A., Di Carlo, R., & Meli, R. (2002). Leptin potentiates IFN-gamma-induced expression of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in murine macrophage J774A.1. *British Journal of Pharmacology*, 137, 799–804. doi:10.1038/sj.bjp.0704903 [doi]

Renehan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F., & Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*, 371, 569–578. doi:10.1016/S0140-6736(08)60269-X

Révillion, F., Charlier, M., Lhotellier, V., Hornez, L., Giard, S., Baranzelli, M. C., ... Peyrat, J. P. (2006). Messenger RNA expression of leptin and leptin receptors and their prognostic value in 322 human primary breast cancers. *Clinical Cancer Research*, 12, 2088–2094. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1904

Riolfo, M., Ferla, R., Valle, L. Del, Piña-Oviedo, S., Scolaro, L., Micciolo, R., ... Surmacz, E. (2010). Leptin and its receptor are overexpressed in brain tumors and correlate with the degree of malignancy. *Brain Pathology*, 20, 481–489. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00323.x

Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Robenek, M. J., Troyer, D., & Severs, N. J. (2006). Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *Journal of Cell Science*, 119, 4215–4224. doi:10.1242/jcs.03191

Roberts DL, Dive C, Renehan AG. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. Annu Rev Med 2010;61:301-16.

Rose, D. P., Komninou, D., & Stephenson, G. D. (2004). Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 5, 153–165. doi:10.1111/j.1467-789X.2004.00142.x

Sa, G., Murugesan, G., Jaye, M., Ivashchenko, Y., & Fox, P. L. (1995). Activation of cytosolic phospholipase A2 by basic fibroblast growth factor via a p42 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation pathway in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 2360–2366. doi:10.1074/jbc.270.5.2360

Sabatini, D. M. (2006). mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Reviews Cancer*, 6, 729–734. doi:10.1038/nrc1974

Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78, 35–43. doi:10.1016/0092-8674(94)90570-3

Sadaf Farooqi, I., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., ... O’Rahilly, S. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 110, 1093–1103. doi:10.1172/JCI200215693

Samaras, K., Botelho, N. K., Chisholm, D. J., & Lord, R. V. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18, 884–889. doi:10.1038/oby.2009.443

Sánchez-Margalef, V., Martín-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Najib, S., & Gonzalez-Yanes, C. (2003). Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clinical and Experimental Immunology*, 133, 11–19. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02190.x

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*. doi:10.1016/j.ceb.2005.09.009

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., ... Sabatini, D. M. (2006a). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, 22, 159–168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., ... Sabatini, D. M. (2006b). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, 22, 159–168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, 307, 1098–1101. doi:10.1126/science.1106148

Saxena, N. K., Sharma, D., Ding, X., Lin, S., Marra, F., Merlin, D., & Anania, F. A. (2007). Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*, 67, 2497–2507. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3075

- Scarfo, L. M., Weller, P. F., & Farber, H. W. (2001). Induction of endothelial cell cytoplasmic lipid bodies during hypoxia. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 280, H294–H301.
- Scherer, P. E., Park, J., & Euhus, D. M. (2011). Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. *Endocrine Reviews*, 32, 550–570. Retrieved from <Go to ISI>://000293574600006
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., & Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 26746–26749. doi:10.1074/jbc.270.45.26746
- Schrader, M. (2001). Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: dynamic behavior and association with lipid droplets. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 49, 1421–1429. doi:10.1177/002215540104901110
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661–671. doi:10.1038/35007534
- Seabra, M. C., Mules, E. H., & Hume, A. N. (2002). Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends in Molecular Medicine*. doi:10.1016/S1471-4914(01)02227-4
- Sharma, D., Saxena, N. K., Vertino, P. M., & Anania, F. A. (2006). Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocrine-Related Cancer*, 13, 629–640. doi:10.1677/erc.1.01169
- Shimomura, I., Funahashi, T., Takahashi, M., Maeda, K., Kotani, K., Nakamura, T., ... Matsuzawa, Y. (1996). Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature Medicine*, 2, 800–803. doi:10.1038/nm0796-800
- Si, Y. C., Eui, S. S., Pil, J. P., Dong, W. S., Hui, K. C., Kim, D., ... Tae, R. L. (2007). Identification of mouse Prp19p as a lipid droplet-associated protein and its possible involvement in the biogenesis of lipid droplets. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 2456–2465. doi:10.1074/jbc.M608042200
- Silva, A. R., de Assis, E. F., Caiado, L. F. C., Marathe, G. K., Bozza, M. T., McIntyre, T. M., ... Castro-Faria-Neto, H. C. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168, 4112–4120.
- Skinner, H. D., Zheng, J. Z., Fang, J., Agani, F., & Jiang, B.-H. (2004). Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1alpha, HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 45643–45651. doi:10.1074/jbc.M404097200

- Somasundar, P., Frankenberg, K. A., Skinner, H., Vedula, G., McFadden, D. W., Riggs, D., ... Vona-Davis, L. C. (2004). Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *The Journal of Surgical Research*, 118, 71–82. doi:10.1016/j.jss.2004.01.017
- Stattin, P., Lukanova, A., Biessy, C., Söderberg, S., Palmqvist, R., Kaaks, R., ... Jellum, E. (2004). Obesity and colon cancer: Does leptin provide a link? *International Journal of Cancer*, 109, 149–152. doi:10.1002/ijc.11668
- Stattin, P., Palmqvist, R., Soderberg, S., Biessy, C., Ardnor, B., Hallmans, G., ... Olsson, T. (2003). Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden. *Oncol Rep*, 10, 2015–21.
- Straub, B. K., Herpel, E., Singer, S., Zimbelmann, R., Breuhahn, K., Macher-Goeppinger, S., ... Schirmacher, P. (2010). Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23, 480–492. doi:10.1038/modpathol.2009.191
- Swinnen, J. V., Brusselmans, K., & Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9, 358–365. doi:10.1097/01.mco.0000232894.28674.30
- Szymanski, K. M., Binns, D., Bartz, R., Grishin, N. V., Li, W.-P., Agarwal, A. K., ... Goodman, J. M. (2007). The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 20890–20895. doi:10.1073/pnas.0704154104
- Tamakoshi, K., Toyoshima, H., Wakai, K., Kojima, M., Suzuki, K., Watanabe, Y., ... Tamakoshi, A. (2005). Leptin is associated with an increased female colorectal cancer risk: A nested case-control study in Japan. *Oncology*, 68, 454–461. doi:10.1159/000086988
- Tartaglia, L. a. (1997). The Leptin Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6093–6096. doi:10.1074/jbc.272.10.6093
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., & Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44507–12. doi:10.1074/jbc.M207712200
- Tian, Z., Sun, R., Wei, H., & Gao, B. (2002). Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: Leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298, 297–302. doi:10.1016/S0006-291X(02)02462-2
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 6, 772–783. doi:10.1038/nri1937
- Turkish, A., & Sturley, S. L. (2007). Regulation of triglyceride metabolism. I. Eukaryotic neutral lipid synthesis: “Many ways to skin ACAT or a DGAT”. *American Journal of*

Tutino, V., Notarnicola, M., Guerra, V., Lorusso, D., & Caruso, M. G. (2011). Increased soluble leptin receptor levels are associated with advanced tumor stage in colorectal cancer patients. *Anticancer Res*, 31, 3381–3383. doi:31/10/3381 [pii]

Uddin, S., Bu, R., Ahmed, M., Abubaker, J., Al-Dayel, F., Bavi, P., & Al-Kuraya, K. S. (2009). Overexpression of leptin receptor predicts an unfavorable outcome in Middle Eastern ovarian cancer. *Molecular Cancer*, 8, 74. doi:10.1186/1476-4598-8-74

Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., ... Thomas, G. (2004a). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 431, 200–205. doi:10.1038/nature02979

Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., ... Thomas, G. (2004b). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 431, 200–205. doi:10.1038/nature02979

Umlauf, E., Csaszar, E., Moertelmaier, M., Schuetz, G. J., Parton, R. G., & Prohaska, R. (2004). Association of stomatin with lipid bodies. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 23699–23709. doi:10.1074/jbc.M310546200

Van Dielen, F. M., van't Veer, C., Schols, A. M., Soeters, P. B., Buurman, W. A., & Greve, J. W. (2001). Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25, 1759–1766. doi:10.1038/sj.ijo.0801825

Van Manen, H.-J., Kraan, Y. M., Roos, D., & Otto, C. (2005). Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10159–10164. doi:10.1073/pnas.0502746102

Velloso, L. A., Araújo, E. P., & De Souza, C. T. (2008). Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *NeuroImmunoModulation*. doi:10.1159/000153423

Vendrell, J., Broch, M., Vilarrasa, N., Molina, A., Gómez, J. M., Gutiérrez, C., ... Richart, C. (2004). Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obesity Research*, 12, 962–971. doi:10.1038/oby.2004.118

Vieira-De-Abreu, A., Assis, E. F., Gomes, G. S., Castro-Faria-Neto, H. C., Weller, P. F., Bandeira-Melo, C., & Bozza, P. T. (2005). Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33, 254–261. doi:10.1165/rcmb.2005-0145OC

Wallace, A. M., Sattar, N., & McMillan, D. C. (1998). Effect of weight loss and the inflammatory response on leptin concentrations in gastrointestinal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 4, 2977–2979. Retrieved from <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865908>

Wältermann, M., Steinbüchel, A., Wa, M., & Steinbu, A. (2005). Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure , Formation , and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots MINIREVIEW Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure , Formation , and Relationship to Eukaryotic Lip, 187(11). doi:10.1128/JB.187.11.3607

Wan, H.-C., Melo, R. C. N., Jin, Z., Dvorak, A. M., & Weller, P. F. (2007a). Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21, 167–178. doi:10.1096/fj.06-6711com

Wan, H.-C., Melo, R. C. N., Jin, Z., Dvorak, A. M., & Weller, P. F. (2007b). Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21, 167–178. doi:10.1096/fj.06-6711com

Wang, D., Chen, J., Chen, H., Duan, Z., Xu, Q., Wei, M., ... Zhong, M. (2012a). Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Journal of Biosciences*, 37, 91–101. doi:10.1007/s12038-011-9172-4

Wang, D., Chen, J., Chen, H., Duan, Z., Xu, Q., Wei, M., ... Zhong, M. (2012b). Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Journal of Biosciences*, 37, 91–101. doi:10.1007/s12038-011-9172-4

Wang, D., Chen, J., Chen, H., Duan, Z., Xu, Q., Wei, M., ... Zhong, M. (2012c). Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Journal of Biosciences*, 37, 91–101. doi:10.1007/s12038-011-9172-4

Weller, P. F., Ackerman, S. J., Nicholson-Weller, A., & Dvorak, A. M. (1989). Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *The American Journal of Pathology*, 135, 947–959.

Weller, P. F., & Dvorak, A. M. (1985). Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood*, 65, 1269–1274.

Weller, P. F., Monahan-Earley, R. A., Dvorak, H. F., & Dvorak, A. M. (1991). Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *The American Journal of Pathology*, 138, 141–148.

Weller, P. F., Ryeom, S. W., Picard, S. T., Ackerman, S. J., & Dvorak, A. M. (1991). Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *Journal of Cell Biology*, 113, 137–146.

Xie, Y., Kang, X., Ackerman IV, W. E., Belury, M. A., Koster, C., Rovin, B. H., ... Kniss, D. A. (2006). Differentiation-dependent regulation of the cyclooxygenase cascade during adipogenesis suggests a complex role for prostaglandins. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 8, 83–93. doi:10.1111/j.1463-1326.2005.00472.x

- Yao, M., Huang, Y., Shioi, K., Hattori, K., Murakami, T., Nakaigawa, N., ... Kubota, Y. (2007). Expression of adipose differentiation-related protein: A predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 13, 152–160. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1877
- Yao, M., Tabuchi, H., Nagashima, Y., Baba, M., Nakaigawa, N., Ishiguro, H., ... Kubota, Y. (2005). Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *The Journal of Pathology*, 205, 377–387. doi:10.1002/path.1693
- Yu, W., Bozza, P. T., Tzizik, D. M., Gray, J. P., Cassara, J., Dvorak, A. M., & Weller, P. F. (1998). Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *The American Journal of Pathology*, 152, 759–769.
- Yu, W., Cassara, J., & Weller, P. F. (2000). Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood*, 95, 1078–1085.
- Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27, 5497–5510. doi:10.1038/onc.2008.245
- Yue, S., Li, J., Lee, S. Y., Lee, H. J., Shao, T., Song, B., ... Cheng, J. X. (2014). Cholestryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metabolism*, 19, 393–406. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.019
- Zhang, H. H., Huang, J., Düvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillance, R. M., ... Manning, B. D. (2009). Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS ONE*, 4. doi:10.1371/journal.pone.0006189
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425–432. doi:10.1038/372425a0
- Zhang, Y., & Scarpace, P. J. (2006). The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiology & Behavior*, 88, 249–256. doi:10.1016/j.physbeh.2006.05.038
- Zhou, H. Y., & Wong, A. S. T. (2006). Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells. *Endocrinology*, 147, 2557–2566. doi:10.1210/en.2005-1404
- Zhou, Y., & Rui, L. (2013). Leptin signaling and leptin resistance. *Frontiers of Medicine*, pp. 1–16. doi:10.1007/s11684-013-0263-5
- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., & Hall, M. N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144, 757–768. doi:10.1016/j.cell.2011.02.014
- Ziyylan, Y. Z., Baltaci, A. K., & Mogulkoc, R. (2009). Leptin transport in the central nervous system. *Cell Biochemistry and Function*. doi:10.1002/cbf.1538

Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12, 21–35. doi:10.1038/nrm3025

Zweytick, D., Athenstaedt, K., & Daum, G. (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1469(2), 101–120. doi:10.1016/S0005-2736(00)00294-7

8. ANEXOS

8.1 Tabela 8.1

Anexo 8.2. Capítulo de livro publicado

8.1.1. MORAES, C.S, JUNIOR, F.O.R.O., MASSON, G., REBELLO, K.M., SANTOS, L.O., FAZOLINI, N.P.B., FARIA, R.C.R. Série em Biologia Celular e Molecular: Métodos experimentais no estudo de proteínas. Editora Instituto Oswaldo Cruz. 1ed. Rio de Janeiro, 2013, 84p.



Anexo 8.3. Artigo submetido

Leptin activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid droplet formation, cytokine production and proliferation

Narayana P.B. Fazolini¹, André L. S. Cruz², Miriam B. F. Werneck², João P.B. Viola², Clarissa M. Maya-Monteiro^{1*} and Patrícia T. Bozza^{1*}

¹Laboratory of Immunopharmacology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Division of Cellular Biology, Brazilian National Institute of Cancer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Key words: Leptin, lipid droplets, mTOR, rapamycin

Abbreviations: mTOR, mammalian target of rapamycin; Rapa, rapamycin; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; IEC-6, rat intestinal epithelial cells; LD, lipid droplets.

*** Corresponding author:** Patrícia T. Bozza and Clarissa M. Maya Monteiro, Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos Rio de Janeiro, 21045-900 RJ, Brazil; E-mail: pbozza@ioc.fiocruz.br, clarissa@ioc.fiocruz.br.

Abstract

Accumulating evidence suggests that obesity and enhanced inflammatory reactions are predisposing conditions for developing colon cancer. Obesity is associated with high levels of circulating leptin. Leptin is a adipocytokine that is secreted by adipose tissue and modulates immune response and inflammation. Lipid droplets (LD) are organelles involved in lipid metabolism and production of inflammatory mediators and increased numbers of LD were observed in human colon cancer. Leptin induces the formation of LD in macrophages in a PI3K/mTOR pathway-dependent manner. Moreover, the mTOR is a serine/threonine kinase that plays a key role in cellular growth and is frequently altered in tumors. We therefore investigated the role of leptin in the modulation of mTOR pathway and regulation of lipid metabolism and inflammatory phenotype in IEC cells. We show that leptin promotes a dose- and time-dependent enhancement of LD formation. The biogenesis of LD was accompanied by enhanced CINC-1 and TGF- β production in these cells. We demonstrated leptin-induced mTORC1 activation with enhanced phosphorilation of the downstream proteins P70S6K and S6 ribosomal protein, and pre-treatment with rapamycin significantly inhibited all leptin effects in IEC cells. Moreover, leptin was able to stimulate the proliferation of epithelial cells with enhanced inflammatory milieu on a mTOR-dependent manner. We conclude that leptin regulates lipid metabolism, cytokine production and proliferation of intestinal cells through a mechanism dependent on activation of the mTOR pathway, thus suggesting that leptin-induced mTOR activation may contribute to the obesity-related enhanced susceptibility to colon carcinoma.

Introduction

The incidence of obesity and its associated disorders is increasing markedly worldwide. Based on results from epidemiological studies, the International Agency for Research on Cancer has concluded that people with obesity are at increased risk of developing several types of cancer, including adenocarcinoma of the oesophagus, colon cancer and breast cancer¹. High-fat diet intake may predispose to the development of colorectal cancer in humans², a phenomenon also shown in animal models reinforcing the existence of a link between fat intake and colorectal cancer³. However, the molecular mechanisms involved in obesity-related tumors are not fully understood.

Adipose tissue is no longer considered to be an inert tissue functioning solely for energy storage, but is emerging as an important player in the regulation of many pathological processes⁴. It is also important in the regulation of energy balance and lipid metabolism through the release of adipokines such as leptin, adiponectin, resistin and tumour necrosis factor- α (TNF α)⁵. Leptin is an adipocyte-derived cytokine mainly secreted by adipocytes that links nutritional status with neuroendocrine and immune functions⁶. Leptin was the first adipocyte-derived hormone/cytokine described, and the plasma leptin concentration is directly proportional to the amount of adipose tissue⁷. Studies in cellular and animal models indicate that leptin can potentiate the growth of cancer cells (breast, oesophageal, gastric, pancreatic, colorectal, prostate, ovarian and lung carcinoma cell lines)⁸. Brandon and cols demonstrated that leptin may accelerate tumor growth while leptin deficiency in the absence of obesity attenuates tumor growth⁹. Furthermore, the leptin receptor is important for the progression of aberrant crypt foci to colonic tumors, mediated by activation of STAT3 signaling¹⁰.

Our group has established that mTOR activity is an important intracellular player in the activation and regulation of lipid metabolism of macrophages induced by leptin^{4, 11}. The

mTOR is a serine/threonine kinase that regulates cellular growth by modulating many processes, including protein synthesis, ribosome biogenesis and autophagy¹². mTORC1 pathway, that is inhibited by rapamycin, regulates growth through downstream effectors, the regulators of translation 4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1) and S6K1 (ribosomal S6 kinase 1)¹³. Rapamycin forms a complex with FK506-binding protein (FKBP)12 and mTOR, resulting in potent inhibition of mTOR signaling^{14,15}. Recently was demonstrated that the mTORC1 complex induce the genes important for glycolysis, the pentose phosphate pathway, and sterol and lipid biosynthesis¹⁶.

It is now well established that upregulated lipogenesis is a common phenotype to numerous human carcinomas and has been associated to poor prognosis in breast, prostate and colon cancer^{17,18 19}. In different cell systems, including adipocytes and macrophages, intracellular lipids are stored and metabolized in hydrophobic organelles called lipid bodies/lipid droplets (LD). Recent studies have described increased numbers of LD in several neoplastic processes including adenocarcinoma of colon²⁰, invasive squamous cervical carcinoma²¹, human brain tumour²² and hepatocarcinoma²³. Human colon adenocarcinoma cell lines and colon cancer biopsies from patients have been shown to exhibit an increase in adipose differentiation-related protein (ADRP), that is a major structural protein associated with LD. The increase in ADRP in those cells is accompanied by COX-2-enriched LD. Furthermore, inhibition of LD formation inhibits PGE₂ production and correlates with diminished cancer cell proliferation²⁰. Indeed, the mechanisms that regulate LD formation and their functional significance to the cellular biology of inflammation and tumorigenesis are now under intense research²⁴.

Nevertheless, a direct role of leptin in normal intestinal epithelial cell lipid metabolism and proliferation has never been described. Here we evaluate the ability of leptin to trigger LD biogenesis and the inflammatory microenvironment in epithelial cells. Leptin effects on LD

formation, COX-2 expression and cell proliferation are strictly dependent on the mTOR pathway. Our results demonstrate new activities of leptin in inflammation and lipid metabolism in epithelial cells and propose a mechanistic link between obesity and enhanced-susceptibility to colon carcinoma.

Results

Leptin triggers lipid droplets biogenesis within rat epithelial cells. Lipid droplets are emerging as dynamic organelles involved in lipid metabolism and inflammation. Our group demonstrated that leptin directly activates macrophages to form adipose differentiation-related protein (ADRP)-enriched lipid droplets¹¹. Increased lipid droplet numbers have been described in colon cancer cells where it was shown to be centrally involved in PGE₂ synthesis. Lipid droplet inhibition blocks cancer cell proliferation, suggesting that lipid droplets might potentially have implications to the pathogenesis of colon adenocarcinoma^{20,24}. We hypothesized a role for leptin in regulating epithelial cell lipid droplets biogenesis and function. As shown in **Fig. 1 A, B**, leptin induced a time and concentration-dependent lipid droplet biogenesis in epithelial cells as quantified by osmium (OsO₄). Panel C shows the fluorescence microscopy of LD staining by oil red O (ORO). The increase in lipid droplets was significant 1 h and maximum 24 h after leptin stimulation (**Fig. 1B**). In addition, we analysed the lipid droplet biogenesis after 6 hours of stimulation with 10, 20, 50 and 100 nM of leptin. Leptin induced an increase in the number of lipid droplets in intestinal epithelial cells at all concentrations used, with an optimal dose of 20 nM. This induction was already significant at the 10 nM dose. Osmium-labeled lipid droplets were quantified and fluorescent area of ORO-labeled lipid droplets were determined confirming the effect of leptin in inducing lipid droplet biogenesis (**Fig. 1A**). Taken together, our results suggest that leptin

induced lipid accumulation in epithelial cells and have a role in regulation of lipid metabolism in these cells.

Leptin-induced production of inflammatory mediators. Inflammation is a critical player in the development of both colitis-associated and sporadic colon cancers. Even in cases of sporadic colon cancer, inflammatory mediators have clearly been associated with tumor promotion within the tumor microenvironment^{25,19}. The cytokines that are secreted by adipose tissue may activate epithelial cells, macrophages and other inflammatory cells. It has recently been demonstrated that tumour-associated macrophages (TAMs) have a key role in the tumour microenvironment²⁶. TAMs are believed to contribute to tissue invasion²⁷, angiogenesis²⁸ and metastasis²⁹. Increased macrophage chemoattractant protein 1 (MCP1; also known as CCL2) in breast tumour extracts is a predictor of early relapse and metastasis²⁹. Thus, it is possible that the activation of macrophages or other inflammatory cells in the setting of obesity may result in increased tumorigenesis. We observed that 20 nM of leptin was able to trigger the release of the pro-inflammatory chemokine CINC-1, but not TNF or IL-6, by intestinal epithelial cells within 6 h (**Fig. 2 A**).

Leptin-induced lipid droplet formation depends on mTOR. mTOR is a serine/threonine kinase that control translation of specific transcripts by regulating key translational mechanisms and is activated downstream of the PI 3-kinase pathway³⁰. Several stimuli, mainly signals from the cell environment and nutrient availability contribute to the activation of mTOR. Insulin and other growth factors can activate mTOR by activation of AKT downstream PI3K with subsequent phosphorylation and inhibition of TSC1 and TSC2 (tuberous sclerosis complex 1 and 2), which is a inhibitor of mTOR³¹. We have demonstrated that leptin regulates macrophage lipid metabolism and inflammation in a PI3K/mTOR

pathway dependent manner¹¹. Of note, mTOR is a kinase that plays a key role in cellular growth and is frequently overexpressed and activated in tumors¹⁴. The role of mTOR in leptin-induced effects on epithelial cell function has never been addressed. We incubated the epithelial cells with 20 nM of leptin for 5, 10, 20 or 40 minutes. As shown in **Fig. 3A**, leptin induced a time- and concentration-dependent phosphorylation of p70S6K and S6 ribosomal in epithelial cells *in vitro*. p70S6K and 4EBP1 are the main downstream protein targets of mTORC1 phosphorylation and activate the translation initiation by activation of the S6 protein and release of the eIF4E, respectively³². We employed rapamycin and everolimus, specific inhibitors of mTOR activity. FK-506, that binds to FKBP12 but does not inhibit mTOR activity, was used as a negative control. These drugs were able to inhibit the phosphorylation of the p70S6K induced by leptin, as shown in **Fig. 3B**.

To investigate the functional role of mTOR activation in leptin-induced epithelial cell activation we employed the pretreatment with rapamycin or everolimus. Both compounds significantly inhibited lipid droplet formation in epithelial cell stimulated by leptin *in vitro*, as shown in **Fig. 4A**. The fluorescent area of ORO-labeled lipid droplets was determined confirming the mTOR dependent effect of leptin in lipid droplet biogenesis (**Fig. 4B**). Collectively, these results indicate that leptin-induced alterations in lipid metabolism and induction of a pro-inflammatory microenvironment were largely dependent on mTOR activation, providing novel links between nutrient regulatory pathways and epithelial cell responses and lipid metabolism.

Leptin modulates COX-2 expression in mTOR-dependent fashion in IEC cells. Next, we investigated the effects of leptin in COX-2 expression. Different products of arachidonic acid (AA) metabolism are also implicated in carcinogenesis. As much as 80% to 90% of colon carcinomas shown enhanced COX-2 (prostaglandin H synthase 2) expression compared with

normal intestinal mucosa³³⁻³⁵. Several evidences suggest that the inflammatory microenvironment and COX-2 overexpression have a central role in colorectal carcinogenesis and recent studies have demonstrated a role for leptin in prostaglandin and leukotriene synthesis by leukocytes and suggest physiological activities for leptin in inflammation^{36,37}. Interestingly, we demonstrated that leptin induces increased COX-2 expression (**Fig. 5A**). We employed rapamycin to investigated the role of mTOR in this phenomenon. Rapamycin was able to inhibit COX-2 expression induced by leptin in epithelial cells. This effect was accompanied by the stimulus to TGF-β production that was also significantly inhibited by rapamycin (**Fig. 5B**).

We can therefore conclude that leptin has a central role in modulating cell transformation-related inflammatory microenvironment through COX-2 overexpression and pro-inflammatory cytokine release in a mTOR-dependent fashion, contributing to the altered intracellular signaling pathways.

***In vitro* leptin-induced epithelial cell proliferation depends on mTOR downstream signaling.** We next examined the effect of leptin on epithelial cell proliferation by staining treated cells with crystal violet. For these experiments, epithelial cells were serum-starved for 16 h followed by treatment with 20 nM of recombinant murine leptin for different time intervals (0, 24, 48, 72 and 96 h). Leptin treatment stimulated the growth of epithelial cells in a time dependent manner when compared to non treated IEC-6 cells. Substantial stimulation was observed 24h and 48h after treatment of cells with leptin (**Fig. 6**). To gain insight into the mechanism underlying the proliferative effect of leptin on epithelial cells, we next evaluated if mTOR activity was important for the leptin effect. Indeed, treatment with rapamycin, besides inhibiting lipid droplet formation, significantly decreased IEC-6 cell proliferation (**Fig. 6B**).

Cellular expansion depends on a balance between cell death and proliferation. Since we observed an important increase in total cell number upon treatment of IEC-6 with leptin (**Fig. 6B**), we decided to evaluate cell cycle progression. IEC-6 cells were cultured as described in the materials and methods and the distribution of cells along the phases of the cell cycle assayed by PI staining and FACS analysis. We detected an accumulation of cells at the S phase upon treatment with leptin (**Fig. 7**) and the treatment with rapamycin leads to an important G0/G1 cell cycle arrest. These results indicate that activation of the mTOR pathway play an important role in the increase of colon epithelial cell proliferation, and therefore may contribute to the promotion of obesity-related colon carcinogenesis.

Discussion

Obesity is an important risk factor for several chronic diseases, including hypertension, dyslipidemia, insulin resistance, diabetes mellitus and many cancers³⁸⁻⁴⁰. Leptin is a hormone/cytokine secreted from adipocytes that is involved with appetite control and energy metabolism through its effects on the hypothalamus. In the non-obese state, higher leptin levels result in decreased appetite through neuroendocrine changes, but during obesity there is the establishment of chronic high leptin plasma levels with hypothalamic resistance⁴¹. The characterization of leptin function in regulating lipid metabolism, inflammatory mediator production and lipid droplet biogenesis in epithelial cells is of importance for understanding its role in the pathogenesis of colon adenocarcinoma and other obesity-related tumors. Here we show that leptin directly activates epithelial cells to form lipid droplets and enhance inflammatory mediator production, in a mechanism dependent on activation of the mTOR pathway. This is the first demonstration that leptin directly regulates the accumulation of lipids within lipid droplets in epithelial cells, thus suggesting that leptin has roles in regulating the lipid metabolism in these cells. We also demonstrated that, in IEC cells, leptin treatment leads to enhanced CINC-1 and TGF- β production, contributing to the acute inflammation and establishment of an inflammatory tumor microenvironment. mTOR's major functions include activation by phosphorylation of S6Kinase and activation of eIF4E by inhibition of 4E-BP1 (4E binding protein). These effects result in cell proliferation¹⁴. It has been described that mutations that enhance the PI-3K/mTOR pathway, the signaling pathway activated upon nutrient sensing, contribute to tumorigenesis of epithelial cells, which include colon carcinoma⁴². Leptin signals through the PI3K/Akt in different cell types, including macrophages. Our group demonstrated that leptin activates the PI3K/mTOR pathway in macrophages, leading to lipid droplet formation and LTB4 generation that are strictly dependent on PI3K and mTOR¹¹. Moreover, leptin-induced hypothalamic effect on food intake

is dependent on the mTOR pathway⁴³. Leptin has also been shown to activate Src kinase and PI3K in the colon cancer cells LS174T and HM7⁴⁴ and promotes invasiveness of the epithelial cells via PI3K-Rho-Rac⁴⁵. Recently, Wang *et al.* showed that leptin receptor is present in colon carcinoma biopsies and correlates with tumor severity and that activation of mTOR by leptin induces proliferation of HTC-116 colon carcinoma cells⁴⁶. During obesity leptin levels are enhanced long before the tumor development, therefore, we hypothesized that leptin might modulate also the non tumor epithelial cell responses through the mTOR pathway. Indeed, in IEC cells, leptin induced a time and concentration-dependent phosphorylation of p70S6K in a rapamycin-sensitive mechanism. Moreover, we show, for the first time, that rapamycin drastically inhibited the lipid droplet formation induced by leptin in epithelial cells, suggesting that mTOR activity, downstream of PI3K, is crucial for leptin effects on the epithelial lipid metabolism. In addition, the sterol-regulatory element-binding proteins, which induce the expression of a large number of genes involved in *de novo* lipid and sterol biosynthesis, have emerged as major effectors of mTORC1 signaling, and mTORC1 activation stimulates lipogenesis⁴⁷. The altered cholesterol phenotype was induced by loss of tumor suppressor PTEN, upregulation of PI3K/AKT/mTOR pathway, and consequent activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) and low-density lipoprotein receptor (LDLr) in prostate cancer. Inhibition of cholesterol esterification significantly suppressed cancer proliferation, migration, invasion, and tumor growth *in vivo*⁴⁸. Cellular proliferation, a common feature of all cancers, requires fatty acids for synthesis of membranes and signaling molecules and most cells store fatty acids in triacylglycerols in the cytosolic lipid droplets. Thus, fatty acids are essential for cancer cell proliferation and limiting their availability could be a new therapeutic strategy⁴⁹.

Adipokines are thought to provide an important link between obesity, insulin resistance and related inflammatory disorders^{1,50}. Inflammation is considered a cancer risk

factor, and a number of inflammatory conditions predispose to colon cancer, including ulcerative colitis and Crohn's disease^{51,52}. Recently, our group demonstrated that lipid droplets in colon cancer cells are dynamic and functional organelles centrally involved in PGE2 synthesis. In addition, lipid droplets have been described as sites to where enzymes involved in prostaglandin synthesis are localized, including cPLA₂ and COX-2²³. In the present study, we show that leptin was also able to induce COX-2 and TGF- β expression in IEC-6 cells and the pretreatment with the mTOR inhibitor rapamycin blocked these effects, suggesting the correlation with this pathway with of a pro-inflammatory environment induction. Accordingly, it has been demonstrated that leptin increases arachidonic acid availability, increases phospholipase A₂ protein expression and activity, and induces COX-2 expression in alveolar macrophages³⁷.

Accumulating evidence indicate a mitogenic effect of leptin on gastric⁵³, breast⁵⁴, ovarian⁵⁵, prostate⁵⁶, and endometrial⁵⁷ cancer cells. However, the mechanisms involved in leptin induced cell proliferation are not completely understood. Ogunwobi and Beales reported that leptin stimulates proliferation through activation of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) system⁵⁸. Moreover, Leptin promotes hepatocellular carcinoma growth, invasiveness, and migration and implicate the JAK/STAT pathway as a critical mediator of leptin action⁵⁹. Here, we demonstrated that leptin stimulates the growth of nontransformed epithelial intestinal cells. This phenomenon is inhibited by rapamycin. Inhibition of lipid body formation by rapamycin, correlated to inhibition of COX-2 generation and epithelial cell proliferation. Proteins with well-established roles in oncogenic cell transformation, tumorigenesis, and metastasis, including PI3K, extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1), ERK2, p38 and PKC, were shown to localize to lipid droplets in a variety of cell types⁶⁰⁻⁶². Moreover, the increase in lipid droplet density stimulates proliferation of colon cancer cells, mainly by loss of FOXO3⁶³

Recent data indicate that carcinogenesis and tumour angiogenesis result not only from the interaction of cancer cells with endothelial cells of various origin (vascular or lymphatic), but also with surrounding ‘normal’ stromal and inflammatory cells⁶⁴. In conclusion, our results add to the current knowledge that mTOR is critically involved in the leptin signaling to activation of epithelial cells, leading to intracellular lipid accumulation, inflammatory mediator production and cell proliferation. Such alterations in lipid metabolism and inflammatory mediator production induced by leptin may provide a favorable microenvironment for increased cell proliferation. Taken together, our results suggest that leptin-induced mTOR activation may contribute to the obesity-related enhanced susceptibility to colon carcinoma by altering the intracellular lipid metabolism and inflammatory environment.

Materials and Methods

Cell culture and *in vitro* stimulation

IEC-6 cells were also grown in DMEM containing 10% FBS supplemented with 0.1 unit of insulin at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. Rat intestinal epithelial cells, IEC-6, were stimulated with leptin (20 nM) for 20 min or 6 h in DMEM medium with 2% fetal bovine serum. In designated groups, cells were pretreated with everolimus (10 nM), FK-506 (10 nM) or rapamycin (20 nM) for 30 min before the addition of the stimuli. Cell viability was always greater than 90%, as determined by trypan blue dye exclusion at the end of each experiment.

Lipid droplet staining and enumeration

Cells (5×10^5 per well) were stimulated with leptin (20 nM) and untreated or treated with rapamycin (20nM), everolimus (10nM) or FK-506 (10 nM) for 6 h. Lipid droplets were stained as previously described in each triplicate well. In brief, cells (5×10^5 cells/mL) were fixed in 3.7% formaldehyde in calcium/magnesium-free HBSS (pH 7.4), rinsed in 0.1 mol/L cacodylate buffer, stained in 1.5% OsO₄ (30 min), rinsed in distilled water (dH₂O), immersed in 1.0% thiocarbohydrazide (5 min), rinsed in 0.1 mol/L cacodylate buffer, restained in 1.5% OsO₄ (3 min), rinsed, and then dried and mounted. The morphology of fixed cells was observed, and lipid droplets were enumerated by light microscopy with 100x objective lens in 50 consecutively scanned cells. Alternatively cells were stained with Oil Red O (lipid fluorescent stain) and Dapi for the analyses of epithelial cell lipid droplet formation in vitro performed 6 h after leptin (20 nM) stimuli and treatment with rapamycin (20 nM). The area of fluorescence was analyzed with the use of Fiji/ImageJ public domain software.

Western Blotting

Cell lysates were prepared in reducing and denaturing conditions and subjected to SDS-PAGE. Samples were submitted to electrophoresis on polyacrylamide gel. After transfer onto

nitrocellulose membranes, nonspecific binding sites were blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline-Tween (TBST; 50mM Tris- HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20). Membranes were probed with anti-phospho-p70S6K (Cell Signaling, Danvers, MA), or anti-p70S6K monoclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA) in TBST. Proteins of interest were then identified by incubating the membrane with horseradish peroxidase conjugated secondary antibody in TBST, followed by detection of antigen-antibody complexes by Supersignal chemiluminescence (Pierce).

Immunolocalization. IEC-6 cells (1×10^4) were stimulated with leptin (24 h) and treated with rapamycin and fixed in 3% formaldehyde at room temperature for 10 min. After permeabilization in 0.2% Triton X-100 for 20 min at room temperature, slides were washed in PBS. The unspecific sites were blocked with 1% normal donkey serum for 10 min. The cells were incubated overnight with goat polyclonal antibody anti-COX-2 (C-20; Santa Cruz Biotechnology). Then, cells were blocked with 1% donkey serum for 10 min before simultaneous incubation with Dylight 488 donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 h. Then, cells were washed several times with PBS, mounted with an aqueous mounting medium with DAPI (Prolong Gold antifade reagent; Life technologies). Slides were viewed by both phase-contrast and fluorescence microscopy, and digital images were obtained using a Hoper Scientific digital camera with the Image-Express software.

Cell proliferation assay. Cells (5×10^4 per well) were stimulated with leptin (20 nM) and untreated or treated with rapamycin (20 nM) for 24, 48, 72, and 96 h. After treatment, cell proliferation was assayed in each triplicate well. Briefly, cells were fixed with ethanol for 10 min, stained with 0.05% violet crystal in 20% ethanol for 10 min, the crystal was extracted with methanol, and the absorbance was quantified in a spectrometer at 595 nm.

Cell cycle analysis. IEC-6 cells were stimulated with leptin (20 nM) and untreated or treated with rapamycin (20 nM) for 24 hours. After treatment, cells were washed and stained with propidium iodide staining solution (4 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 nM NaCl, 0.1% NP-40, 700 U/L Ribonuclease A, 0.075 mM propidium iodide). DNA content analysis was performed by flow cytometry in a FACScalibur equipment (BD Biosciences).

Statistical analysis. Statistical analysis of values from control and treated groups was determined using an unpaired Student's t test for single comparison or an ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls for multiple comparisons. P < 0.05 was considered to be statistically significant.

References

1. Calle E E, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun, M J. **Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U. S. adults** (2003) N. Engl. J. Med. 348:1625–1638.
2. Giovannucci E, Goldin B. **The role of fat, fatty acids, and total energy intake in the etiology of human colon cancer** (1997) Am J Clin Nutr. 66:1564S–71S.
3. Reddy BS. **Dietary fat and colon cancer: animal model studies** (1992) Lipids 27:807–13.
4. Maya-Monteiro CM, Bozza PT. **Leptin and mTOR: partners in metabolism and inflammation** (2008) Cell Cycle 7(12):1713-7.
5. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue** (1994) Nature 372:425-32.
6. Lam, QL, Lu L. **Role of leptin in immunity** (2007) Cell Mol. Immunol. 4: 1–13.
7. La Cava A, Matarese G. **The weight of leptin in immunity** (2004) Nat Rev Immunol 4:371-9.
8. Garofalo C, Surmacz E. **Leptin and cancer** (2005) J. Cell. Physiol. 207:12–22
9. Yue S, Li J, Lee SY, Lee HJ, Shao T, Song, B, Cheng L, Masterson TA, Liu X, Ratliff TL, Cheng JX. **Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness** (2014) Cell Metabolism 19(3): 393-406
10. Higurashi T, Endo H, Uchiyama T et al. **Conditional knockout of the leptin receptor in the colonic epithelium revealed the local effects of leptin receptor signaling in the progression of colonic tumors in mice** (2014) Carcinogenesis 35:9, 2134–2141.
11. Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, Bozza PT. **Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism** (2008) J Biol Chem 283:2203-10.
12. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. **Growing roles for the mTOR pathway** (2005) Curr. Opin. Cell Biol. 17, 596–603.
13. Sabatini DM. **mTOR and cancer: insights into a complex relationship** (2006) Nat Rev Cancer 6(9):729-34.
14. Houghton PJ, Easton JB. **mTOR and cancer therapy** (2006) Oncogene 25: 6436–6446.
15. Li J, Kim SG, Blenis J. **Rapamycin: One Drug, Many Effects** (2014) Cell Metabolism 19(3): 373-9.
16. Duvel K, Yecies JL, Menon S et al. **Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1** (2010) Molecular Cell 39:171–183.
17. Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G. **Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets** (2006) Curr Opin Clin Nutr Metab Care 9:358-365.
18. Kuhajda FP. **Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway** (2006) Cancer Res 66:5977-5980
19. Schetter AJ, Nguyen GH, Bowman ED, Mathe EA, Yuen ST, Hawkes JE, et al. **Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer- specific mortality of colon adenocarcinoma** (2009) Clin Cancer Res 15:5878-87
20. Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, et al. **Lipid droplets are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells** (2008) Cancer Res 68(6):1732-40.
21. Than NG, Sumegi B, Bellyei S, Berki T, Szekeres G, Janaky T, Szigeti A, Bohn H, Than GN. **Lipid droplet and milk lipid globule membrane associated placental protein 17b**

- (PP17b) is involved in apoptotic and differentiation processes of human epithelial cervical carcinoma cells** (2003) Eur J Biochem 270:176-1188.
22. Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. **An investigation of human brain tumour lipids by high-resolution magic angle spinning ^1H MRS and histological analysis** (2008) NMR Biomed 21:677-685.
 23. Dvorak AM, Weller PF, Harvey VS, Morgan ES, Dvorak HF. **Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid droplets** (1993) Int Arch Allergy Immunol 101:136-142.
 24. Bozza PT, Viola JP. **Lipid droplets in inflammation and cancer** (2010) Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.82 (4-6):243-50.
 25. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, & Karin M. **Inflammation and colon cancer** (2010) Gastroenterology 138:2101-14 e5.
 26. Pollard JW. **Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis** (2004) Nature Rev. Cancer 4:71-78.
 27. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. **MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis** (2000) Cell 103:481-490.
 28. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. **The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis** (2008) Nature Rev. Cancer 8, 618-631.
 29. Qian, B. Z. et al. **CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis** (2011) Nature 475, 222-225.
 30. Brunn GJ, Fadden P, Haystead TA, Lawrence JC Jr. **The mammalian target of rapamycin phosphorylates sites having a (Ser/Thr)-Pro motif and is activated by antidiroples to a region near its COOH terminus** (1997) J Biol Chem 272:32547-50
 31. Schetter AJ, Nguyen GH, Bowman ED, Mathe EA, Yuen ST, Hawkes JE, et al. **Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer- specific mortality of colon adenocarcinoma** (2009) Clin Cancer Res 15:5878-87
 32. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. **Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex** (2005) Science 307:1098-1101
 33. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, et al. **Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer** (1995) Cancer Res 55:3785-9.
 34. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, et al. **Upregulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas** (1994) Gastroenterology 107:1183-8.
 35. Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, et al. **Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer** (1995) Cancer Res 55:2556-9.
 36. Mancuso P, Canetti C, Gottschalk A, Tithof PK, and Peters-Golden M. **Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2gamma) protein expression** (2004) Am. J. Physiol. 287:L497-L502.
 37. Raso GM, Pacilio M, Esposito E, Coppola A, Di Carlo R, Meli R. **Leptin potentiates IFN-gamma-induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A.1** (2002) J. Pharmacol.137:799-804.
 38. Rahmouni K, Correia MLG, Haynes WG, Mark AL. **Obesity associated hypertension: new insights into mechanisms** (2005) Hypertension 45:9-14.
 39. Ravussin E, Smith SR. **Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus** (2002) Ann. NY Acad. Sci. 967:363-378.
 40. Kahn BB, Flier JS. **Obesity and insulin resistance** (2000) J. Clin. Invest. 106: 473-481.

41. Hursting SD, Smith SM, Lashinger LM, Harvey AE, Perkins SN. **Calories and carcinogenesis: lessons learned from 30 years of calorie restriction research** (2010) *Carcinogenesis* 31(1):83-9.
42. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. **Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer** (2009) *Nat Rev Drug Discov* 8:627-44.
43. Cota, D, Proulx K , Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, and Seeley RJ. **Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake** (2006) *Science* 312:927-930.
44. Jaffe T, Schwartz B. **Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal transduction pathways** (2008) *Int J Cancer* 123: 2543-2556.
45. Attoub A, Noe V, Pirola L, Bruyneel E, Chastre E, Mareel M, Wymann MP, Gespach C. **Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, Rho-, and Rac-dependent signaling pathways** (2000) *Faseb J* 14(14): 2329-38.
46. Wang D, Chen J, Chen H, Duan Z, Xu Q, Wei M, Wang L, Zhong M. **Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway** (2012) *J. Biosci.* 37(1): 91-101.
47. Laplante M, Sabatini DM. **An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis** (2009) *Curr Biol* 19:1046-1052.
48. Yue S, Li J, Lee SY, Lee HJ, Shao T, Song, B, Cheng L, Masterson TA, Liu X, Ratliff TL, Cheng JX. **Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness** (2014) *Cell Metabolism* 19(3): 393-406
49. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RVJr. **Cellular fatty acid metabolism and cancer** (2013) *Cell Metabolism* 18(2): 153-61
50. Weisberg SP et al. **CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding** (2006) *J. Clin. Invest.* 116:115-124
51. Jess T, Gamborg M, Matzen P et al. **Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies** (2005) *Am J Gastroenterol* 100:2724-9.
52. Coussens LM, Werb Z. **Inflammation and cancer** (2002) *Nature* 420:860-7.
53. Pai R, Lin C, Tran T, Tarnawski A. **Leptin activates STAT and ERK2 pathways and induces gastric cancer cell proliferation** (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 331:984-92.
54. Rose DP, Komninou D, Stephenson GD. **Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer** (2008) *Obes Rev* 5:153-65.
55. Choi JH, Park SH, Leung PC, Choi KC. **Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells** (2005) *J Clin Endocrinol Metab* 90:207-10.
56. Somasundar P, Frankenberg KA, Skinner H et al. **Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin** (2004) *J Surg Res* 118:71-82.
57. Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, Anania FA. **Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways** (2006) *Endocr Relat Cancer* 13:629-40.
58. Ogunwobi OO, Beales IL. **Leptin stimulates the proliferation of human oesophageal adenocarcinoma cells via HB-EGF and Tgfalpha mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor** (2008) *Br J Biomed Sci* 65: 121-127.
59. Saxena e cols. **Concomitant Activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK Signaling Is Involved in Leptin-Mediated Promotion of Invasion and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells** (2007) *Cancer Res* 67(6):2497-507

60. Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, et al. **Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid droplets** (1998) Am J Pathol 152: 759–69
61. Yu W, Cassara J, Weller PF. **Phosphatidylinositide 3- kinase localizes to cytoplasmic lipid droplets in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells** (2000) Blood 95:1078–85.
62. Chen JS, Greenberg AS, Wang SM. **Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages** (2002) J Cell Biochem 86:784–91.
63. Qi W, Fitchev PS, Cornwell ML, Greenberg J, Cabe M, Weber CR, Roy HK, Crawford SE, Savikovic DS. **FOXO3 growth inhibition of colonic cells is dependent on intraepithelial lipid droplet density** (2013) J Biol Chem 288(23): 16274-81.
64. Bissell, MJ, Labarge MA. **Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment?** (2005) Cancer Cell 7:7–23.

Funding

This work was supported by grants from by FAPERJ, CNPq, CAPES, INCT-Cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors are indebted with Dr. Leonardo K Teixeira for helpful suggestions, Dr. Jens Rietdorf (CDTS) for assistance with imaging processing and to Edson F. Assis for technical assistance.

Figure legends

Figure 1. Effects of Leptin on IEC cells lipid droplet formation. IEC cells were treated with different leptin concentrations for 6 h (A) or with 20 nM leptin for different times (B). After incubations the cells were stained with Osmium tetroxide and the lipid droplets counted. (C) IEC cells were stimulated with 20 nM of leptin in 6 h and the lipid droplets were labeled with Oil Red O. The results are representative of at least 3 experiments. The symbols (*, ** ;***) represent significant differences from controls according to the Student's T test when p<0,05.

Fig 2. Leptin induces inflammatory mediator production and activates the mTOR downstream signaling. (A) Measurements of CINC-1 and TGF β after six hours of incubation with leptin in the culture supernatants. (*) represent significant differences from controls and from leptin treated samples; according to the Student's T test when p <0,05. IEC cells were incubated with leptin 20 nM for the time dependence curve (B, bottom panels), or for 20 min for the leptin concentration curve (A, upper panels). After incubations the cells were harvested and Western blotting for phosphorilated P70S6K (pP70S6K) and total P70S6K were performed. The results are representative of at least 3 experiments.

Fig 3. The leptin effects on IEC cells are dependent on mTOR pathway. (A) IEC cells were incubated with 10, 20, 40 e 100 nM of leptin for 20 minutes and with leptin (20nM) for 0, 5, 10, 20 and 40 minutes. After incubations the cells were harvested and Western blotting for phosphorilated P70S6K (pP70S6K) and total P70S6K were performed (B) The IEC cells were incubated with leptin (20 nM, 20 min) in the absence or presence of mTOR inhibitor, rapamycin (20nM). After

incubations the cells were harvested and Western blottings for phosphorilated P70S6K (pP70S6K) and total P70S6K were performed. Cells were also incubated with leptin (20 nM, 6h) in the absence or presence of rapamycin (20 nM) or everolimus (20 nM). The results are representative of at least 3 experiments. (CT: control; Fk: FK-506; Lep: Leptin; L+E: Leptin plus everolimus)

Fig. 4. Leptin-induced epithelial cell lipid droplet formation is requisitely dependent on mTOR activity. (A) Lipid droplet counting in IEC cells after *in vitro* incubation for 6h with leptin (20 nM) alone or in the presence of rapamycin (20 nM) or everolimus (20 nM) as indicated. *, statistically significant differences between leptin and control; +, statistically significant difference between rapamycin-treated and leptin stimulated groups. +, statistically significant difference between everolimus-treated and leptin stimulated groups. (B) The fluorescent area of ORO-labeled lipid droplets were measured with Fiji/ImageJ after incubation for 6h with leptin (20 nM) alone or in the presence of rapamycin (20 nM). *, statistically significant differences between leptin and control.. (CT: control; Rapa: Rapamycin; Lep: Leptin; L+R: Leptin plus rapamycin)

Fig. 5. Leptin stimulates COX-2 overexpression and TGF- β production in a mTOR dependent fashion. (A) Cells were incubated with leptin (20 nM) in the absence or presence of rapamycin (20nM). After incubations, cells were processed for Imunofluorescence detection. The cells were labeled with anti-Cox-2 antibody and a secondary dylight 488 labeled antibody. (B) The supernatants from incubations with leptin (20nM) for 6 h and/or treated with rapamycin (20 nM) were obtained and TGF- β measurement by ELISA. The results are representative of

at least 3 experiments; (*) represent significant differences from controls; (+) or (#) represent significant differences from leptin treated samples. (L+R: Leptin plus rapamycin)

Fig. 6. Leptin stimulates IEC cell proliferation in a mTOR dependent manner.

Cells were incubated with leptin (20 nM) in the absence or presence of rapamycin (20nM). After incubations the cells were incubated with Crystal Violet. (A) Image of the plate wells of cells treated for 120 h. (B) Quantification of the Crystal Violet stain absorbance after extracting it from the culture plates in different time points. (*) represent significant differences between leptin treated and control; and (+) represent significant differences between leptin treated and leptin plus rapamycin groups; according to the Student's T test when $p<0,05$.

Fig. 7. Leptin stimulates cell cycle entrance and progression of IEC cells in a mTOR dependent manner. Cells were incubated with leptin (20 nM) in the absence or presence of rapamycin (20nM) for 48 hours. After incubation, cell cycle progression was evaluated by propidium iodide staining and flow cytometry analysis. The percentages of cells in each stage of the cell cycle (G_0/G_1 , S, and G_2/M) are indicated.

Figure 1

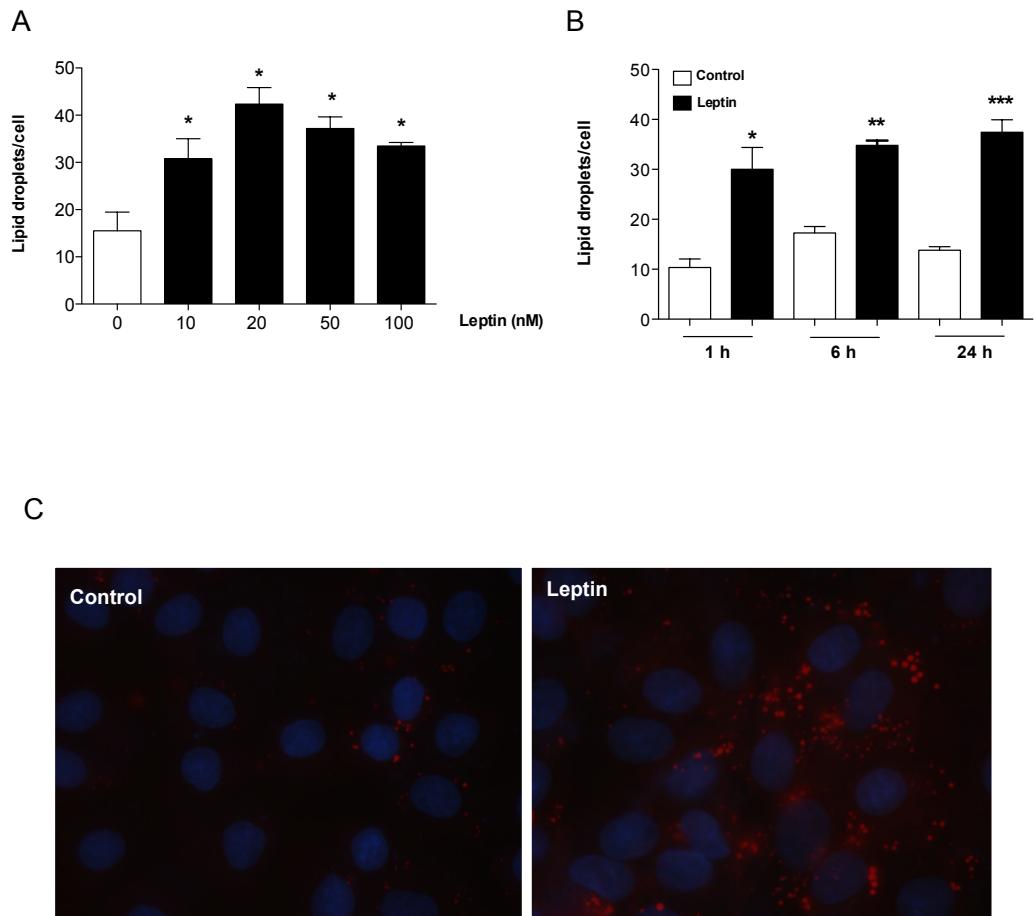


Figure 2

A

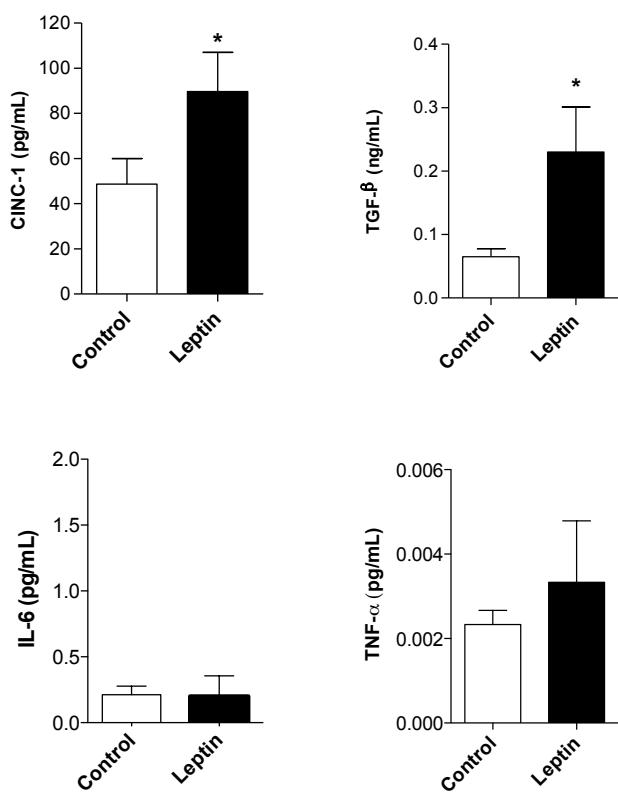


Figure 3

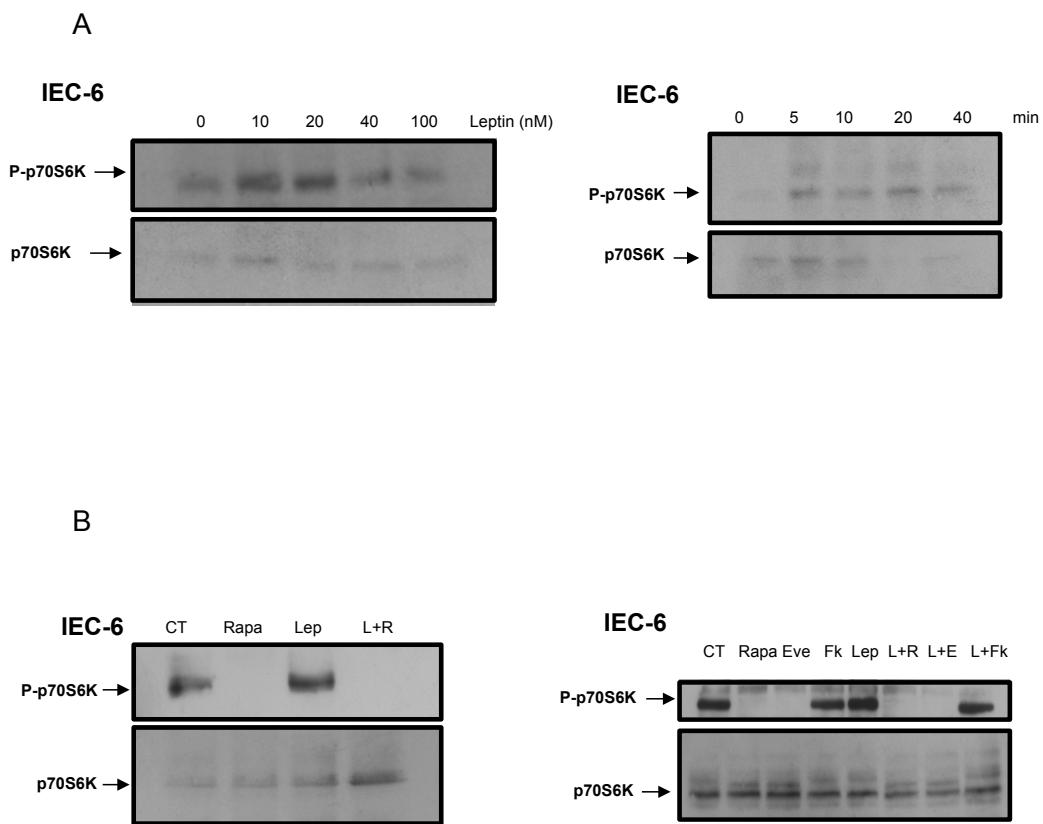


Figure 4

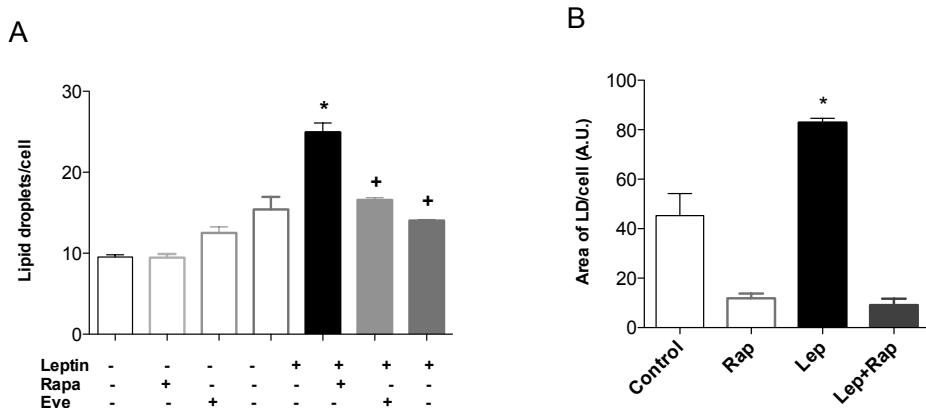
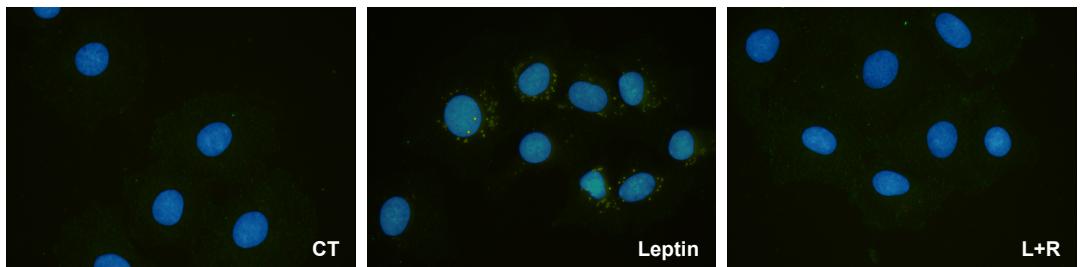


Figure 5

A



B

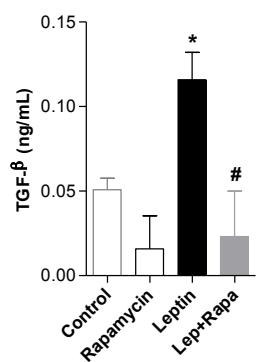
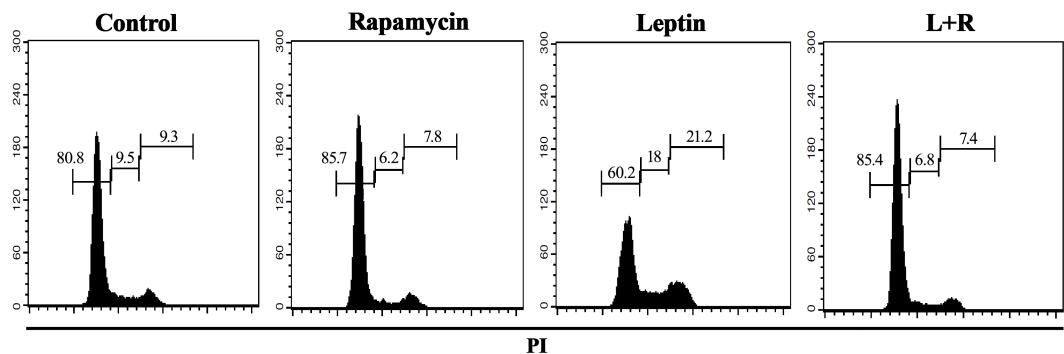


Figure 7



Anexo 8.4. Revisão em fase final de preparação

Lipid droplets in cell signaling and cancer

André L. S. Cruz^{1*}, Narayana P.B. Fazolini^{2*}, João P. B. Viola² and Patricia T. Bozza¹

¹Division of Cellular Biology, National Cancer Institute and ²Laboratory of Immunopharmacology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ; and Rio de Janeiro, Brazil.

*ALSC and NPBF contributed equally to this work.

Author for correspondence: Patricia T. Bozza, Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil – 21045-900.
Tel (5521) 2562-1767; Email: pbozza@ioc.fiocruz.br

SUMMARY

1. INTRODUCTION

1.1. Models for lipid droplets biogenesis and signaling pathways involved in lipid droplet formation

1.2. *Lipid droplets biogenesis in cancer*

1.3. *Lipid Droplet Structure and Composition*

2. IMPLICATIONS OF LIPID DROPLETS IN CANCER

2.1. Lipid Droplets During Inflammation and Tumor Microenvironment Establishment

2.2. Lipid Droplets in Cell Metabolism

2.3. Lipid droplets in Cell Proliferation

2.4. Lipid droplets in Apoptosis and Cell Death

2.5. Lipid droplets in Hypoxia

3. CONCLUDING REMARKS

4. REFERENCES

ABSTRACT

Lipid droplets are lipid-rich, cytoplasmic organelles that play important roles in cell signaling, lipid metabolism, membrane trafficking, and production of inflammatory mediators. Lipid droplet biogenesis is a regulated process, and accumulation of these organelles within leukocytes, epithelial cells, hepatocytes, and other non-adipocyte cells is a frequently observed phenotype in several physiologic or pathogenic situations, and thoroughly described during inflammatory conditions. Moreover, in the last years several studies described an increase of intracellular lipids in different neoplastic processes, although it is not clear so far if lipid droplets accumulation is directly involved in the establishment of these different types of malignancies. This review discusses current evidence related to the biogenesis, composition and function of lipid droplets that related to hallmarks of cancer: inflammation, cell metabolism, increased proliferation, escape from cell death, and hypoxia.

1. INTRODUCTION

Lipid droplets are cytoplasmic lipid-enriched organelles with multiple functions in cell physiology and pathophysiological mechanisms. These organelles are heterogeneous in size and composition, and referred by different terms such as “lipid bodies”, “lipid globules”, or “adiposomes” (Murphy, 2001; Martin and Parton, 2006). Lipid droplets are described as one of the major forms of macromolecular lipid composition in biological systems, the other being the lipid bilayer that composes all cellular membranes (Murphy, 2001). Until a few years, lipid droplets were associated mostly to tissues with a role in lipid accumulation or transport, especially to adipose tissue or hepatocytes in mammals. However, increasingly evidences start to shed light on the functions lipid droplets play in physiological or pathological conditions, and nowadays they are considered dynamic and ubiquitous organelles (Martin and Parton, 2006). It has been suggested that lipid droplets are involved in lipid trafficking, cellular signaling, and production and secretion of inflammatory mediators (Martin and Parton, 2006; Bozza et al., 2009; Bozza and Viola, 2010). Also, the mechanisms that regulate the formation of lipid droplets and their functional significance for tumorigenesis are now under intense investigation (Bozza and Viola, 2010).

1.1. Models for lipid droplets biogenesis and signaling pathways involved in lipid droplet formation

Lipid droplets are lipid-rich cytoplasmic organelles delimited by a monolayer of amphipathic phospholipid, glicolipids, and steroids, which circles a hydrophobic core composed by neutral lipids such as triacylglycerols (TAGs), diacylglycerols (DAGs), cholesteryl esters, retinyl esters, and free cholesterol (Tauchi-Sato et al., 2002; Martin and Parton, 2005; Bozza et al., 2009; Walther and Farese, 2012). Although the morphology and composition of lipid droplets are well known, the molecular and cellular mechanisms involved in lipid droplets biogenesis are still not completely understood. On the other hand, major advances have been made in this field in recent years, and hypothetical models for lipid droplets biogenesis were proposed. Essentially, these models share the concept that these organelles originate and are intimately related to the endoplasmic reticulum (ER), based on the transfer of lipids and proteins from

the ER to newly formed lipid droplets (Martin and Parton, 2006; Bozza et al., 2009). The first and still largely accepted model of lipid droplets formation suggests that these organelles are derived from the accumulation of newly synthesized lipids within the double layer of the ER membrane, with subsequent budding off from the ER to the cytoplasm after reaching a critical size (Tauchi-Sato et al., 2002; Martin and Parton, 2006). According to this model, a newly formed hydrophobic neutral lipid core detaches itself creating an independent organelle, surrounded by a phospholipid monolayer derived from the cytoplasmic leaflet of the ER coated with proteins that lack transmembrane spawning domains (Brown, 2001; Murphy, 2001; Robenek et al., 2004; Martin and Parton, 2006; Brasaemle and Wolins, 2012).

Accumulating evidence from different studies suggests however a greater complexity of lipid droplet formation and structure than initially anticipated, giving rise to new hypothetical models for lipid droplet biogenesis (Robenek et al., 2004; Ploegh, 2007; Wan et al., 2007; Bozza et al., 2009; Guo et al., 2009). One of these alternate models is based on cryofracture microscopy experiments, which reveals apparent ER membranous structures in close contact with lipid droplets. In fact, the authors postulate that newly formed lipid droplets originate close to ER in chalice-shaped clefts, where lipid droplets structural proteins would mediate transport and deposit of neutral lipids (Robenek et al., 2006). In addition, electron microscopy studies have reported images suggestive of membranous structures, such as membrane "wrinkles", within lipid droplets. This would allow the localization of proteins with predicted membrane insertions and transmembrane domains to permeate lipid droplet cores (Dvorak et al., 1992, 1993, 1994; Bozza et al., 1997; Robenek et al., 2005; Walther and Farese, 2009). In agreement with this model, findings of *in situ* enzymatic activity within lipid droplets, such as eicosanoid production discussed below (Section 2.1), suggest the existence of subcompartments inside these organelles made possible through the incorporation of ER-derived membranes (Wan et al., 2007; Bozza et al., 2009; Melo et al., 2013; Melo and Weller, 2014).

Lipid droplets biogenesis is an induced, well-regulated process, and dependent on several stimuli in each specific cell type. In the presence of interleukins or chemokines, leukocytes rapidly form lipid droplets even in absence of exogenous lipids (Bozza et al., 1998; Bartemes et al., 1999; Bandeira-Melo et al., 2001, 2002; Pacheco et al., 2007). In neutrophils, lipid droplets are induced *in vitro* after stimulus with platelet-activating factor (PAF), protein kinase C (PKC) activators, or *cis*-unsaturated fatty acids such as oleic acid or arachidonic acid (Weller et al., 1989, 1991; Bozza et al., 1996a, 1996b). Increase in lipid droplet biogenesis in neutrophils and macrophages can also be triggered by lipopolysaccharides (LPS) or oxidized low-density lipoproteins (oxLDL), but not native LDL, indicating the role of receptor-mediated events (Ross, 1995; Li and Glass, 2002; Pacheco et al., 2002; Silva et al., 2002; Schimitz and Grandl, 2008). Also, it has been described that leptin can promote formation of lipid droplets in macrophages, showing an important role of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) in this process (Maya-Monteiro et al., 2008). Besides leukocytes, distinct signaling pathways in lipid droplets biogenesis were availed in other cell types. In epithelial cells, lipid droplets formation was detected after treatment with unsaturated fatty acids, involving PI3K and p38 kinase activity (Moreira et al., 2009). The function of phospholipase D1 and ERK2 was evaluated both in fibroblasts and in a cell-free

system (Andersson et al., 2006), and it was revealed that P311 protein has a pivotal role in lipid droplets biogenesis in lung fibroblasts after retinoic acid stimulation (Leung et al., 2008). Moreover, serum-induced lipid droplets formation in several cell types depends on citosolic phospholipase A2- α (cPLA2- α) phosphorylation on Ser⁵⁰⁵ residue, mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) and ceramide kinase (Gubern et al., 2008, 2009). In mouse adipocytes, Prp19p and fat specific protein 27 (FSP27) were identified as lipid droplets constituents, and necessary for their biogenesis (Cho et al., 2007; Puri et al., 2007; Nishino et al., 2008). Also, a homologue for seipin, a protein involved in an autosomal recessive disorder known as Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy, is necessary for lipid droplets formation in yeast (Szymanski et al., 2007; Fei et al., 2008). And in endothelial cells, lipid droplets formations was seen during hypoxia through PCK activation and tyrosine kinases-dependent signaling (Scarfó et al., 2000).

Lipid droplets biogenesis is a highly dynamic process, in which is possible to detect newly formed organelles until one hour after stimulus. Thus, studies addressed the necessity of protein synthesis in this process. Pre-treatment of leukocytes with protein synthesis inhibitors partially interrupted the induction of new lipid droplets after PAF stimulation (Bozza et al., 1997), suggesting that, depending of the stimulus, *de novo* protein synthesis and activation of early genes is important for this process to occur (Bozza et al., 1996a; 1996b; 1997; Bandeira-Melo et al., 2001b; Pacheco et al., 2002). Indeed, signaling control of protein synthesis and stability contributes to the dynamics of lipid droplet accumulation. The mTOR-dependent signaling pathway was shown to be important in the translational control of lipid droplet biogenesis (Maya-Monteiro and Bozza, 2008), since leptin-induced lipid droplets were drastically reduced by treatment with the mTOR inhibitor rapamycin (Maya-Monteiro et al., 2008). It has been suggested that mTOR controls the translation of adipocyte differentiation-related protein (ADRP) in adipocytes stimulated with conjugated linoleic acid and in macrophages stimulated with leptin (Chung et al., 2005; Maya-Monteiro et al., 2008). ADRP is a lipid droplets structural protein known to be directly involved in lipid biogenesis, and increased ADRP expression by itself has been shown to directly correlate with an enhanced capacity of neutral lipid storage, as ADRP promotes intracellular accumulation of triglycerides and cholesterol, and reduces cholesterol efflux (Larigauderie et al., 2004). ADRP may also act as a nucleation center for the assembly of lipids to form nascent lipid droplets, and enhance its stability in lipolytic conditions (Wang et al., 2003; Gross et al., 2006). Transcription-dependent mechanisms are also involved in lipid droplets biogenesis. The peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), a family of nuclear transcription factors, were associated to lipid droplets formation during macrophage differentiation (Nagy et al., 1998; Tontonoz et al., 1998). Specific PPAR γ ligands potentiate lipid droplets biogenesis induced by oxLDL, by PAF-like agonists, and by granulocytes colony-stimulating factor (G-CSF) (De Assis et al., 2003; Inazawa et al., 2003). PPAR γ directly regulates the expression of several genes participating in fatty acid uptake, lipid storage and the inflammatory response by binding to specific DNA response elements in target genes as heterodimers with the retinoid X receptors (RXR), including fatty acid synthase and ADRP (Gearing et al., 1993; Keller et al., 1993; Chawla et al., 2001).

1.2. Lipid droplets biogenesis in cancer

Increasingly information about lipid droplets biology has been gathered during the last few decades, and consequently its potential role in the pathophysiology of diseases is gradually being revealed. Increase in lipid content and defect in lipids regulation are common phenotypes seen in some of these cases, and several studies associate the increase of lipid droplets formation to extremely spread and economically relevant diseases, like diabetes (Boström et al., 2007; Boström et al., 2010), atherosclerosis (Larigauderie et al., 2004; 2006; Paul et al., 2008), and inflammatory processes (Ridley e Ridley, 1987; Triggiani et al., 1995; Bozza et al., 1996b; Hernandez-Pando et al., 1997; Cardona et al., 2000; Pacheco et al., 2002; D'Avila et al., 2006; Pacheco et al., 2007). In the same manner, upregulated lipogenesis is also seen in numerous carcinomas and has been associated with poor prognosis in breast, prostate and colon cancer. (Swinnen et al., 2006; Kuhajda et al., 2006). Two processes may be responsible for the increased numbers of lipid droplets in tumor cells: the association of transformed cells with adipose tissue surrounding the tumor site or necrotic parts within the tumor (Zoula et al., 2003; Moritani et al., 2011; Nieman et al., 2011); and intrinsic changes to lipid metabolism. Altered lipid metabolism in cancer cells involves modulation of numerous lipogenic enzymes (Kuhajda 2006; Wang et al., 2012), and culminates in the accumulation of newly formed lipid in cytoplasmic lipid droplets (Table 1). Indeed, enhanced numbers of lipid droplets have been described in several neoplastic process, including colon adenocarcinoma (Accioly et al., 2008), invasive squamous cervical carcinoma (Than et al., 2003); human brain tumor (Opstad et al., 2008), hepatocarcinoma (Dvorak et al., 1993), and Burkitt lymphoma (Ambrosio et al., 2012) (Table 1), and may be directly associated with events of cellular transformation.

The observation that some neoplastic cells exhibit increased numbers of lipid droplets has raised the possibility of using the detection of lipid droplets and/or overexpression of PAT proteins (perilipin, ADRP, and tail-interacting protein of 47 kDa) as biomarkers for specific cancer types, cancer stage, or cancer aggressiveness (Table 1). For example, it has been described that PAT proteins are frequently expressed in neoplastic tissues which develop some degree of steatosis, such as hepatic, colorectal, and renal cell carcinomas, albeit each of these cancer types exhibits a distinct pattern and distinct expression levels of each PAT family member (Straub et al. 2010). Among all PAT proteins, the relevance that ADRP is attaining as a potential biomarker for tumorigenesis is of particular interest. This is supported by the differential expression of ADRP in several human carcinomas such as renal cell carcinomas, hepatocellular carcinoma, colon carcinoma, and in the apocrine carcinoma of the breast (Rae et al. 2000; Kurokawa et al. 2004; Yao et al. 2005, 2007; Matsubara et al. 2011; Moritani et al. 2011). ADRP overexpression was also found in malignant or premalignant cutaneous lesions (Ostler et al. 2010). Interestingly, ADRP was recently pointed out as an interesting biomarker for Burkitt lymphoma, especially because of its specific overexpression pattern when compared with diffuse large B cell lymphomas (Ambrosio et al. 2012). Using lipid-body-associated proteins as transformation biomarkers would be useful to distinguish tumor types and staging, as seen between two lymphomas that exhibit a similar cytological presentation.

Although recently published data suggest that the increase of lipid droplet numbers occurring in cells undergoing cell proliferation is a common feature in many neoplastic process and may contribute towards cell proliferation, no definitive studies are presently available that establish a causal link between cytoplasmic lipid droplet increase and carcinogenesis. Evidently, further work on the mechanistic impact of increased lipid body formation in tumor cells is still needed. Nevertheless, this review will focus on the multiple roles that lipid droplets may fulfill in several cancer scenarios, summarizing recent advances in understanding lipid droplets participation for the establishment of some hallmarks of cancer in the multistep development of tumors (Hanahan and Weinberg, 2011). Also, we discuss the detection of cancer-related proteins through analysis of proteomic studies targeted on lipid droplets extracted from both malignant and non-malignant cells.

1.3. Lipid Droplet Structure and Composition

Over the past decade, there has been a rise in interest in the interactions of proteins surrounding intracellular LD. The various proteomics studies that have been published, some proteins are seen in all studies, whereas some proteins are unique to an individual study. In part, this might arise from the fact that different cells and cell lines have been used, with the results being influenced by the fact that certain proteins are expressed in a cell-specific manner. The proteins associated with LD have been characterized in different specialized mammalian cell types including 3T3-L1 adipocytes, mammary epithelial cells, hepatic cells (Hodges and Wu, 2010), Caco-2/TC7 enterocytes (Bouchoux et al., 2011), muscle cells (Zhang et al., 2011) and insulin producing β -cells (Larsson et al., 2012). These studies indicate that the proteome of cytosolic LD depends on the cell type although common features occur. The structural PLIN proteins (Kimmel et al., 2010) are always present on LD. Proteomic analyses of LD from human monocytic U937 cells detected proteins involved in cholesterol and triglyceride metabolism, Rab GTPases and many membrane and endoplasmic reticulum (ER)-associated proteins. Moreover, the presence of ribosomes, ER-like membranes and many membrane-associated and ER luminal proteins within LD, indicates that LD may be sites of protein synthesis (Wan et al., 2007). This hypothesis is supported by the demonstration in lipid droplets of 3H-uridine accumulation and mRNA detection by *in situ* hybridization (Dvorak, 2005). Proteomic analyses of purified leukocyte-derived lipid droplet fractions identified several ribosomal subunit proteins as well as translation initiation factors (Wan et al., 2007). Moreover, ribosomal and RNA-interacting proteins have also identified in proteomic analyses of lipid droplets from a hepatoma cell line expressing the capsid protein from hepatitis C virus (Sato et al., 2006).

A recent total proteome study of LD from mammalian cells revealed a total of 125 proteins (Bartz et al., 2007). Along with the known droplet structural proteins, various lipid synthetic enzymes and membrane trafficking proteins were identified. Among those were 18 Rab proteins, which can be classified as GTP-dependent switches that control the inter-compartmental flow of membranes (Liu et al., 2004). Proteomic studies of phosphorylated proteins on lipid droplets isolated from Hela cells identified 45 phosphorylated proteins, including ADRP, Rab, and ATGL (Bartz et al., 2007; Kim et al., 2006). The presence of caveolin has been demonstrated on newly formed lipid droplets

from microsomal membranes lacking raft structures (reviewed in Olofsson et al., 2008). Further studies are needed to unravel the role of caveolin in the biology of the LD.

LD may also play an active role in lipid synthesis. Lipid synthetic enzymes have been found on lipid droplets isolated from mammalian cells (Bozza et al., 2011, Zhang et al., 2010). Proteome of LD fractions isolated from Caco-2/TC7 enterocytes expressing or not hepatitis C virus core protein by a differential proteomic approach (iTRAQ) identified 42 proteins, 21 being involved in lipid metabolism (Beilstein et al., 2013). Perilipin-1 is found specifically on the adipocyte lipid droplet, perilipin-5/OXPAT is expressed in cells that have a high capacity for fatty acid oxidation, such as cardiac muscle cells, while perilipin-2/ADFP/ADRP and perilipin-3/TIP47 are ubiquitous (Wolins et al., 2006). Enzymes involved in cholesterol biosynthesis have been routinely identified in proteomic studies (Hodges and Wu, 2010; Bouchoux et al., 2011; Bartz et al., 2007). One study compared Cholesterol Ester (CE) enriched-LD with TAG-enriched LD using tandem mass tags based proteomics, where found 278 proteins in similar amounts. These proteins included proteins previously found on LD, including membrane trafficking proteins annexin 2, Rab5c, and Rab8a, structural proteins vimentin, a-tubulin, and b-tubulin, chaperone proteins HSPa8, HSPd1, GRP78, HSP70, and HSP90, as well as LD protein ADRP (Plin2) and Vdac1, last one that is involved in lipid transfer within the mitochondria (Khor et al., 2014). Several in vitro studies have verified both the presence and activity of these enzymes on lipid droplets (Sorger et al., 2002; Moessinger et al., 2011; Fujimoto et al., 2007), suggesting that the lipid droplet is a cellular site for some steps of lipid synthesis.

Together, proteomic studies not only demonstrate the dynamic activities of lipid droplets but also provide important information for further mechanistic investigation of this organelle in many diseases like obesity, diabetes and cancer.

2. IMPLICATIONS OF LIPID DROPLETS IN CANCER

2.1. Lipid Droplets in Inflammation and Tumor Microenvironment Establishment

LD accumulation during inflammatory conditions has been extensively documented in leukocytes. In these cells, LDs are linked to the regulation of immune responses by compartmentalization of several proteins and lipids involved in the control and amplification of eicosanoid biosynthesis. Arachidonic acid is one major ingredient of animal fats and the biologically active lipids derived from this substrate have crucial roles in chronic inflammation and cancer. The metabolism of arachidonic acid by cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX) and P450 epoxygenase pathways generates eicosanoids, including prostanoids, leukotrienes, hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs), and others. Epidemiological, clinical and animal studies provide evidence that activation of COX and LOX pathways during chronic inflammation and carcinogenesis results in aberrant metabolism of arachidonic acid (Wang and Dubois, 2010).

LD in leukocytes are remarkably linked to inflammatory responses and considered structural markers of inflammation (reviewed in Melo et al., 2011, and in Saka and Valdivia, 2012). Analyses of lipid droplets in different cell types and stimulatory conditions demonstrated that lipid droplets are particularly active

sites for the metabolism of arachidonyl lipids. Electron microscopic, auto radiographic and subcellular fractionation observations demonstrated that arachidonate is incorporated and esterified prominently in lipid droplets of leukocytes, epithelial cells and neoplastic cells (Dvorak et al., 1983, 1993; Weller et al., 1989, 1991; Plotkowski et al., 2008). Free arachidonic acid is an extremely reactive molecule that functions in cell signaling, acting as an intracellular second messenger, as a paracrine mediator of cell activation and as substrate for enzymatic conversion into eicosanoids (Yaqoob, 2003; Six and Dennis, 2000). Although negligible amounts of free arachidonic acid were identified in lipid droplets, different enzymes involved in arachidonic acid metabolism were demonstrated to localize in lipid droplets, thus providing strong evidence for major role for lipid droplets in arachidonic acid metabolism. Arachidonic acid is inert and protected within the droplet. To function as a signaling molecule, arachidonic acid must be released by phospholipases and the free arachidonate then gains access to eicosanoid-forming enzymes. cPLA2 hydrolyzes arachidonic acid from the sn-2 position of glycerophospholipids and is the rate-limiting enzyme in the formation of eicosanoids and PAF (Ghosh et al., 2006). cPLA2 and its activating protein kinases, ERK1 and ERK2, were demonstrated to co-localize at LD in cells responding to a wide range of stimuli, including arachidonic acid (Moreira et al., 2009, Wooten et al., 2008). Furthermore, high cPLA2 specific activity was enriched in purified LD-containing fraction (Yu et al., 1998).

It has been established that lipid bodies are specialized, inducible cytoplasmic domains that have central roles to control the synthesis and secretion of inflammatory mediators, regulating for example the type and amount of eicosanoid produced. A role for LD in enhanced eicosanoid generation is supported by the presence of key eicosanoid-forming enzymes to these organelles during inflammatory and neoplastic conditions. By analyzing cells stimulated in vitro (Dvorak et al., 1992, 1993; Bozza et al., 1997, 1998; Accioly et al., 2008; Silva et al., 2009) or obtained from in vivo inflammatory responses (Pacheco et al., 2002; Vieira-de-Abreu et al., 2005; D'Avila et al., 2006; Maya-Monteiro et al., 2008), the major enzymes 5-LO, 15-LO and COX, involved in the enzymatic conversion of AA into eicosanoids, were shown to localize within LD by using a variety of stimulatory conditions and techniques, including immunocytochemistry and immunofluorescence, ultrastructural post-embedding immunogold labeling, and western blotting from subcellular fractions. Moreover, LTC4-synthase, PGE-synthase and FLAP, members of the membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism family (MAPEG), can be found within LD (Accioly et al., 2008; Silva et al., 2009; Bozza et al., 1997, 2009; Araujo-Santos et al., 2010). Together, these data suggest that LD may compartmentalize the complete enzymatic machinery for eicosanoid synthesis on inflammatory and neoplastic conditions, contributing to amplification of the inflammatory mediators production. Importantly, eicosanoid formation within lipid droplets is not restricted to leukocytes. Cells that produce high quantities of eicosanoids under physiological conditions were demonstrated to exhibit high lipid droplets numbers containing eicosanoid synthesizing enzymes, including granulosa cells of periovulatory follicles involved in the production of PGE₂, necessary for normal ovulation (Seachord et al., 2005), luteal steroid-producing and interstitial cells involved in regression of the corpus

luteum (Arend et al., 2004), and fetal membranes with advancing gestation and labor (Meadows et al., 2003, 2005).

It's also important to note that significant correlations between LD formation and enhanced generation of both 5-LO- and COX-derived eicosanoids (LTC₄, LTB₄ and PGE₂) were observed, thus indicating that LD numbers in leukocytes would result in enhanced capacity of eicosanoid production in vitro (Bozza et al., 1996a, 1996b, 1997, 1998; Pacheco et al., 2007; Weller et al., 1999; Bartemes et al., 1999) and in vivo (Pacheco et al., 2002; Maya-Monteiro et al., 2008; Vieira-de-Abreu et al., 2005; de Assis et al., 2003; Melo et al., 2003; Silva et al., 2002). Collectively, the data gathered indicate a role for LD in favoring the increased eicosanoid production. Even though evidence of correct recruitment, assembly and activation of the eicosanoid forming enzymatic machinery has been provided, direct proof of eicosanoid synthesis at the different subcellular compartments came only after the development of a lipid immunolabeling technique termed EicosaCell. This method has served as a tool to immobilize and label eicosanoids at the exact locale of their synthesis and has given further insight into the functionality of subcellular protein organization. Since eicosanoids are not stored, but are synthesized and released immediately, we do not analyze translocation, but only compartmentalization of their synthesis (reviewed in Bandeira-Melo et al., 2011). The first evidence of eicosanoid-synthesis within a compartment different from the perinuclear membrane came from a study performed by Bozza and collaborators (Bozza et al., 1997). Interestingly, the LD are the major intracellular sites for the activation-elicited formation of LTC₄ (Schaloske and Dennis, 2006; Wooten et al., 2008; Vieira-de-Abreu et al., 2005), and LTB₄ (Bozza and Weller, 2001) in macrophages and neutrophils, and PGE₂ in macrophages and epithelial cells (Weller et al., 1989, 1999; Roulin et al., 1999; Weibel et al., 2009).

There is increasing evidence that LD may act as sites for inflammatory mediators in other cell types and not are restricted to inflammatory responses. Enzymes involved in PG synthesis, such as phospholipase A₂, were associated with LB formation in cells from human fetal membranes (Meadows et al., 2005) and in an epithelial cell line stimulated with arachidonic acid or oleic acid (Moreira et al., 2009). Moreover, PGE₂ production was directly detected within LD from epithelial cells, indicating a potential role for these organelles in epithelial cell-driven inflammatory functions (Moreira et al., 2009). One recent study demonstrated the biogenesis of LD in muscle cells cultured with the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii* and showed a significant time-dependent increase in PGE₂ generation that positively correlated with LD formation in *T. gondii*-infected muscle cells, but not in uninfected cells (Gomes et al., 2014). Interestingly, endothelial and epithelial cells related with pathological conditions such as in cancer, hypoxia and during infections were shown to contain increased numbers of eicosanoid-synthesizing LD (Dvorak et al., 1992, 1993, 1994; Scarfo et al., 2001; Meadows et al., 2005; Accioly et al., 2008; Plotkowski et al., 2008; Paiva et al., 2010). Moreover, the heterogeneity of composition and function of LD in hepatocytes during inflammatory conditions is discussed. Under resting conditions, hepatic stellate cells displayed high numbers of large droplets that are implicated in the storage of retinoids (vitamin A and its metabolites) and present undetectable levels of leukotriene production (Paiva et al., 2010; Blaner et al., 2009; Friedman, 2008; Borojevic et al., 1990; Guaragna et al., 1991). Although retinoid storage ability is lost during hepatic

stellate cell activation including during schistosomiasis infection (Paiva et al., 2010; Blaner et al., 2009; Friedman, 2008; Borojevic et al., 1990; Guaragna et al., 1991), schistosome-derived hepatic stellate cells LD are sites of 5-LO compartmentalization and acquire leukotriene formation functions (Paiva et al., 2010). In agreement of a role for schistosome-derived hepatic stellate cell LD in leukotriene formation, lipid bodies contribute to leukotriene production in response to pathogen infections in different cell types and pathological conditions (Pacheco et al., 2002, 2007; D'Avila et al., 2006; Sorgi et al., 2009). Altogether, these features highlight the potential heterogeneity of lipid bodies and suggest that many aspects of its structure and function depend on cell type, activation state and inflammatory environment.

2.2. Lipid Droplets and Lipid Metabolism in Cancer

Changes in lipid metabolism can affect numerous aspects of cell homeostasis, such as the availability of structural lipids for membrane synthesis and energy production and the magnitude of the lipid-based inflammatory mediators produced. Each of these factors has a strong impact on vital cellular processes, including cell growth, proliferation, differentiation, and motility, and thus impact on cancer promotion and growth (Santos and Schulze 2012). On the basis of this, enzymes involved in lipid mobilization from lipid storage sites such as lipid droplets may be appropriate targets for cancer therapy and drug development.

Accordingly, recent reports suggest a relationship between lipolytic and lipogenic enzymes with tumor development. For example, Nomura and collaborators showed that aggressive human cancer cells acquire the ability to liberate fatty acids from lipid neutral stores as a consequence of heightened expression of a lipolytic enzyme, monoacylglycerol lipase (MAGL). Also, this fatty acid network is enhanced by oncogenic signaling lipids, such as PGE2 and lysophosphatidic acid, which promote migration, invasion, survival, and *in vivo* tumor growth (Nomura et al. 2010). Moreover, overexpression of MAGL increases the pathogenicity of nonaggressive tumor cell lines, whereas the use of a specific MAGL inhibitor was sufficient to cause this phenotype to revert (Nomura et al. 2010). Taken together, these data strongly designate MAGL as a potential pharmacological target for cancer therapy.

The discovery of a fat mobilization mechanism between stromal and cancer cells brought into the picture a possible role for lipid accumulation also in microenvironment-induced tumor growth and metastasis. Metastasis of ovarian cancer to the omentum was shown to be mediated by local adipocytes, which promoted the initial homing of tumor cells through secretion of IL-6, IL-8, MCP-1, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) (Nieman et al. 2011). Subsequently, adipocytes provided fatty acids to cancer cells, which displayed increased lipid droplet formation and increased activity and expression of key enzymes for β -oxidation, and consequentially developed into larger tumor masses (Nieman et al. 2011). Remarkably, this mechanism was not limited to ovarian cancer cells, but was also true for breast and colon malignant cells (Nieman et al. 2011), and provides a rationale for sustained growth of cancer metastasis targeted to an adipocyte-rich environment. It was pointed out that fatty acid binding protein 4 (FABP4), a member of the lipid chaperone-like proteins FABPs which bears variable and selective affinity for long chain fatty acids (Furuhashi and Hotamisligil, 2008), is directly involved in the metabolic changes that occur in ovarian cancer metastasis at the omentum (Nieman et al.

2011). Expression of FABP4 in metastatic cancer was associated with the proximity to stromal adipocytes, since immunohistochemical staining revealed strong FABP4 expression in ovarian cancer cells at the adipocyte-cancer cell interface (Nieman et al., 2011). Moreover, the use of a FABP4 inhibitor drastically reduced lipid accumulation in cancer cells, and knockdown of FABP4 in host mice adipocytes reduced ovarian cancer metastasis and tumor burden in the omentum (Nieman et al. 2011). Interestingly, FABP4 was previously described in macrophages as a pivotal enzyme for cholesterol traffic and associated inflammation (Makowski et al. 2005), and an increased amount of FABP4 in plasma was also associated with carotid atherosclerosis or acute ischemic stroke (Holm et al. 2011). Impairment of FABP4 expression in macrophages suppressed the inflammatory function of these cells, including decreased expression of COX-2 and diminished PGE2 production (Makowski et al. 2005). These findings support the relevance of lipid storage mobilization not only for energy delivery for cancer growth, but also during formation of an inflammatory microenvironment, which could conjunctly help tumor establishment. Accordingly, other reports have suggested the development of specific therapies that target the cross talk and fueling of cancer metabolism by the microenvironment (Pavlides et al. 2009; Martinez-Outschoorn et al. 2010).

Alongside tumor fueling, lipid metabolism was also implicated in cancer-associated cachexia (CAC), a multifactorial metabolic syndrome associated with loss of muscle and adipose mass (Tisdale, 2009). CAC is supposed to be the immediate cause of death in about 15% of cancer patients (Deans and Wigmore, 2005; Fearon and Moses, 2002), but the mechanistic events that lead to this syndrome are still poorly understood. CAC pathogenesis is associated with severe lipid loss, and an increased secretion of lipolytic factors has been described in CAC patients (Tisdale, 2009). Based on this, Das and collaborators hypothesized that disruption of fat catabolism could prevent initiation and/or progression of CAC (Das et al., 2011). To evaluate this, wild-type mice or mice lacking either *Atgl* or *Hsl* genes were submitted to cancer-associated cachexia by subcutaneous injection of Lewis lung carcinoma cells or B16 melanoma cells. To note, adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) are the enzymes most widely responsible for the hydrolysis of triacylglycerols from lipid droplets fat storage (Zechner et al., 2009). After subtracting tumor weight, wild-type mice bearing tumors displayed decreased total body weight and reduce white adipose tissue (WAT) when compared with healthy counterparts (Das et al., 2011). In contrast, body weight of *Atgl*^{-/-} mice with tumors were always identical to *Atgl*^{-/-} mice without tumors, whereas *Hsl*^{-/-} displayed an intermediate phenotype (Das et al., 2011). Surprisingly, disruption of *Atgl* in tumor-bearing mice prevented not only WAT wasting, but preserved the mass of gastrocnemius muscle as well, whereas wild-type mice bearing tumors displayed gastrocnemius muscle atrophy (Das et al., 2011). Also, the authors revealed that increased ATGL or HSL hydrolase activity in visceral WAT correlates negatively with body mass index of cancer patients (Das et al., 2011). Although the mechanism for protection of adipose and muscle loss in lipase-deficient mice was not clarified, based on these results the pharmacological inhibition of lipases may contribute to cancer-associated cachexia prevention.

2.3. Lipid Droplets in Cell Proliferation

Recently published data has shown that an increase in lipid droplet numbers occurs in cells undergoing cell proliferation and that this is a common feature in many neoplastic processes (Bozza and Viola, 2010). Although they suggest it may contribute to cell proliferation, no definitive studies are presently available that establish a causal link between the increase in lipid droplet numbers and development of cancer.

Interestingly, a variety of signaling-associated proteins have been demonstrated to compartmentalize within lipid droplets, suggesting a key role for this organelle as a cytoplasmic hub favoring proliferative intracellular signaling. Proteins with well-established roles in oncogenic cell transformation, tumorigenesis, and metastasis, including PI3K, ERK1, ERK2, p38, PKC and caveolin, were shown to localize to lipid droplets in a variety of cell types (Yu et al., 1998; Yu et al., 2000; Pol et al., 2001; Fugimoto et al., 2001; Chen et al., 2002; Cohen et al., 2004). As stated previously, the presence of MAP kinases ERK1, ERK2, and P38 in lipid droplets is linked to activation of cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) and mobilization of arachidonic acid from glycerophospholipids in response to extracellular stimuli (Yu et al., 1998). PI3K regulatory and catalytic subunits were also localized to lipid droplets in a human histiocytic lymphoma cell line and in PAF-stimulated human neutrophils (Yu et al., 2000). Of note, co-immunoprecipitation studies demonstrated PI3K subunit p85 to be physically associated with phosphorylated Lyn kinase in lipid droplets of activated human neutrophils (Yu et al., 2000), which is fully compatible with the possibility that PI3K-mediated signaling may be active within cytoplasmic lipid droplets. Interestingly, the signaling axis PI3K/Akt/mTORC1 is known to induce the activity at least one of the sterol regulatory element-binding proteins (SREBP), a group of transcription factors that regulates fatty acid, phospholipid, cholesterol, and triacylglycerol synthesis (Horton, 2002). In this sense, mTORC1 can target SREBP in multiple ways, including induction of SREBP processing, regulation of protein stability, and modulation of its subcellular localization (Shao and Espenshade, 2012). Thus, activation of oncogenic pathways such as PI3K could stimulate lipid synthesis and accumulation, supported by the evidence that SREBP transcriptional factors are overexpressed in a number of cancers (Mendez and Lupu, 2007). Despite this, until now no study unraveled the actual role of lipid droplet-resident kinases to cell proliferation, although it is supposed that compartmentalization of kinase-mediated signaling within lipid droplets may act as scaffold to favor quick intracellular signaling upon cellular stimulation mediated by specific membrane receptors. Hence, lipid droplets could be a potential downstream target against uncontrolled triggering of membrane receptors signaling cascade.

The wide variety of signaling-associated proteins localized to lipid droplets suggests that these organelles may partake in cellular proliferation and differentiation. One of the possible mechanisms that remains to be addressed is in which manner lipid droplets contribute to cell cycle progression, and if lipid droplet-biosynthesis or composition may play a role in uncontrolled proliferation that culminate in pathologies such as cancer. The first mechanistic insights on how lipid droplets may participate in cell cycle regulation were provided by studies in budding yeast suggestive of a direct link between cell cycle-regulatory kinases and lipid droplet-derived triacylglycerol degradation (Kurat et al, 2009). It was observed that the yeast lipase Tgl4, an analogue of the human lipase

ATGL that colocalizes in lipid droplets, is a target for phosphorylation by the major yeast cell cycle regulator, Cdc28 (human CDK1 analogue) (Kurat et al., 2009). Absence of Cdc28-mediated phosphorylation leads to a loss of Tgl4 lipolyse activity and, consequently, a delay on bud formation and cell cycle progression. In addition, combined inhibition of both lipid hydrolysis and fatty acids production completely abolished progression through G1 cell cycle phase (Kurat et al., 2009). Together, these data suggest the existence of a general mechanism in yeast that coordinates membrane synthesis with cell-cycle progression. More recently, another work demonstrated that lipid droplets regulation may be tightly coordinated with cell cycle progression in fission yeast. In this model, events of lipid droplet formation were observed by time-lapse confocal microscopy during G2 cell cycle phase, divided between de novo biogenesis and a supposedly fission process of preexistent lipid droplets (Long et al., 2012).

A positive correlation of lipid droplet increase in numbers and cell proliferation has been established as well in colon cancer cells (Aciolly et al., 2008). Although not clear if it is cause or consequence of the transformation process, a clear dependency of the maintenance of these lipid bodies for continued cellular proliferation was established. Accordingly, an association between lipid droplets and cell proliferation has also been observed in the regenerating liver of caveolin-1 knockout mice (Fernandez et al., 2006). Caveolin-1 belongs to a group of proteins involved in caveolae formation and lipid homeostasis, and was previously described as important for lipid droplets biogenesis (Martin and Parton, 2006). Hepatocytes from caveolin-1 deficient mice exhibit a reduced number of lipid droplets and cell cycle arrest at the G1 phase following partial hepatectomy, which impaired liver regeneration and reduced mice survival (Fernandez et al., 2006). Since glucose administration was able to reestablish cell cycle progression, it is possible that, in this system, caveolin-containing lipid droplets supply hepatocytes with energy to fuel its high metabolic rate, enabling proliferation (Brasaemle 2006; Fernandez et al., 2006). Interestingly, delayed liver regeneration was also observed in ADRP knockout mice (Kohjima t al., 2013), in which hepatic triglycerides content has been previously described as markedly reduced (Chang et al., 2010). Nevertheless, despite all promising data concerning lipid droplets and cell cycle progression, until now it is still unclear whether lipid droplets directly play a role in cell proliferation.

Still, an interesting study revealed that specific lipids molecules play active roles and are essential for cellular division. Establishing a lipidomic comparison between mitotic and S cell cycle phase cells, Atilla-Gockumen and collaborators discovered that eleven lipid species accumulate at least 4-fold in cytokinesis, including an unusual sterol derivative and an ether/ester-linked phosphatidic acid which differs from diesters phospholipids traditionally found in mammalian cells (Atilla-Gockumen et al., 2014). Eight of the lipids identified were described as subspecies within the sphingolipid family, and accordingly, disruption of several enzymes involved in sphingolipid metabolism, among others lipid-related enzymes, caused cell division defects (Atilla-Gockumen et al., 2014). Using atomic force microscopy, the authors also revealed that lipids isolated from dividing cells have distinct morphological and mechanical proprieties, and plasma membrane from cells in cytokinesis displayed increased mechanical resistance, being able to withstand substantially higher forces applied during force spectroscopy (Atilla-Gockumen et al., 2014). Finally, it was observed that

dividing cells specifically regulate their lipid composition at midbodies, a transient structure seen near the end of cytokinesis just prior to the complete separation of the daughter cells (Atilla-Gockumen et al., 2014). Collectively, these data shows that cells not only regulate precisely the timing to synthesize specific lipids, but also the where these lipids are located within larger structures of the cell. Besides, this work shed light to the importance of lipid composition for a fundamental biological process such as cellular division.

2.4. Lipid Droplets in Apoptosis and Cell Death

It has been reported that apoptosis induction leads to accumulation of lipid droplets (Callies et al. 1993; Hakumaki and Kauppinen 2000; Blankenberg 2008). In a practical application, an increase in cellular lipid droplet content has been used as an *in vivo* marker of post treatment tumor cell death through ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy, a noninvasive diagnostic technique (Hakumaki et al. 1999; Blankenberg 2008). Given that lipid droplet accumulation is one of the first events that occurs on apoptosis induction, techniques based on ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy should be useful in detecting the earliest signs of cell death following cancer treatment. Moreover, the early onset of lipid droplets formation during apoptosis may delay accumulation of toxic fatty acids. Indeed, increased lipogenesis and/or induced β -oxidation protected skeletal muscle cells and pancreatic β cells from toxicity associated with free fatty acids (Henique et al. 2010; Choi et al. 2011). It was recently described that early lipid accumulation in apoptotic cells is due to inhibition of mitochondrial fatty acid β -oxidation and redirection of fatty acids to de novo lipid synthesis, occurring downstream of apoptosis-induced activation of p53 and inhibition of mTOR signaling pathways (Boren and Brindle 2012). Also, mitochondrial dysfunction and increased levels of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) correlated with inhibition of fatty acid oxidation (Boren and Brindle 2012). Similar effects were seen in tumor cells after MYC inhibition, which caused accumulation of lipid droplets as a direct consequence of mitochondrial dysfunction (Zirath et al., 2013). Even though these evidences about the relationship between lipid droplets and cell death may attract attention to a possible function in cancer cell survival, the relevance of lipid droplet biogenesis during apoptotic or preapoptotic events is still largely unknown.

Recently, a large-scale transcriptome analysis using human microarray datasets of normal brain tissues or glioblastoma tissues revealed an interesting correlation between regulative apoptotic caspases and genes involved in cholesterol homeostasis (Picco et al., 2014). In this work, genes were hierarchically clustered according to similarity in correlation of expression levels between different caspases and cholesterol homeostasis genes, revealing that the expression of regulatory apoptotic caspases (CASP2, CASP8, CASP9, CASP10) and the inflammatory caspase CASP1 is linked to several genes involved in cholesterol biosynthesis, cholesterol import/absorption, cholesterol export, steroid and bile acid synthesis, and lipid transcriptional regulators (Picco et al., 2014). Surprisingly, these correlations are less robust in glioblastoma when compared with normal brain datasets, and CASP1 distinctly changes relationships with cholesterol genes, now clustering with effector caspases (Picco et al., 2014). Also, abrogation of caspase-2 expression in glioblastoma cell lines reduced the number of detectable lipid droplets in these cells, and the number of cells harboring those organelles (Picco et al., 2014). It was suggested

that the observed correlations could be orchestrated by selected transcriptional factors related to lipid homeostasis that display similar expression correlations to the aforementioned caspases. Nonetheless, the possible implications of regulatory apoptotic caspases to cholesterol production remain inconclusive, since a strong positive correlation between regulatory apoptotic caspases and cholesterol biosynthesis genes was opposed to a negative correlation with HMGRC gene, which represents the rate limiting step in cholesterol biosynthesis pathway (Picco et al., 2014). Moreover, these correlations between regulatory apoptotic caspases and cholesterol genes appear to be stronger in the brain, since microarrays of normal human liver showed a less pronounced and more restricted correlation. Still, since in glioblastoma the correlations between regulatory apoptotic caspases and cholesterol genes are less prominent than normal brain, it is suggested that oncogenic driven changes, that results in altered proliferation and increased survival, could also impact on cholesterol homeostasis in this scenario by unbalancing the co-regulation of caspases and cholesterol genes.

2.5. Lipid Droplets in Hypoxia

Hypoxia is defined as a reduction of oxygen (O_2) concentration, a condition encountered in a variety of pathological conditions such as stroke, tissue ischemia and inflammation, as well as in the core of solid tumors where vasculature is abnormal or restrict. Whereas in healthy mammalian tissues O_2 levels are maintained at 2%-9% (40 mm Hg average), hypoxic conditions are usually defined as $\leq 2\% O_2$, and severe hypoxia (or anoxia) is defined as $\leq 0.02\% O_2$ (Bertout et al., 2008). Hypoxia responses are transcriptionally regulated by hypoxia-inducible factor (HIF) family, which are heterodimeric transcription factors consisting of an oxygen-regulated α -subunit (HIF-1 α or HIF-2 α), and a constitutively expressed β -subunit (HIF- β /ARNT) (Wenger, 2002; Kaelin and Ratcliffe, 2008; Bertout et al., 2008). Hanahan and Weinberg suggest that hypoxia response system not only causes an induction of the “angiogenic switch” in cancer (Hanahan and Folkman, 1996), but is also one of the factors that acts for the reprogramming of cancer cell metabolism (Hanahan and Weinberg, 2011; de Huang et al., 2014). In fact, some evidence points out important changes on lipid metabolism in these occasions. For example, fatty acid synthase was found to be upregulated during hypoxia through HIF-1 α /Akt/SREBP-1 signaling pathway (Furuta et al., 2008), suggesting that increased fatty acid synthesis is thought to be stimulated in low O_2 conditions. Moreover, reductive metabolism of α -ketoglutarate could be used during hypoxia to synthesize acetyl-CoA for fatty acid production (Metallo et al., 2011; Sun and Denko, 2014), a mechanism that was also seen in tumor cells with mitochondrial defects in the citric acid cycle or in the electron transport chain (Mullen et al., 2011). In another study, HIF-1 α activation, seen as a result of decreased oxygen availability in cardiac hypertrophy development, can orchestrate an adaptive response where HIF-1 α increases glycolysis and free fatty acids uptake by upregulation of PPAR γ expression (Krishnan et al., 2009). Hypoxia can also promote uptake of LDL and VLDL through HIF-1-mediated induction of VLDLR expression (Shen et al., 2012). In the other hand, it was also demonstrated that hypoxia could lead to reduced de novo fatty acid synthesis in mice alcoholic fatty liver disease (Nishiyama et al., 2012). Specific loss of HIF-1 α in this scenario is able to induce SREBP-1 activation, resulting in expression

of its downstream target acetyl-Coa carboxylase (ACC) and increased lipid accumulation in hepatocytes (Nishiyama et al., 2012). These alterations were inversely correlated with the expression of differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1), a HIF-1 α target gene and also a SREBP-1 repressor (Nishiyama et al., 2012). Nevertheless, it is clear that hypoxia responses can alter significantly the cell lipid metabolism in several pathologies, including cancer.

The evidences presented above support the idea that lipid droplets could be accumulated in hypoxic cells. It was first revealed that lipid droplets could be induced during conditions of acute or chronic hypoxia in endothelial cells derived from bovine aortic or pulmonary vascular beds (Scarfó et al., 2001). In this work, it was observed an inverse correlation between oxygen concentration and lipid droplets levels, including a decrease of lipid droplets induction in endothelial cells exposed to mild hyperoxia (Scarfó et al., 2001). Also, induction of lipid droplets during oxygen deprivation appeared unique among other cellular stresses in which these cells were submitted, such as sub-lethal changes in temperature or glucose deprivation (Scarfó et al., 2001), suggesting that lipid droplets formation during hypoxia is a distinctive response of endothelial cells to a decrease of O₂ concentration rather than a standardized response for any variety of cellular stress. In accordance to that, ADRP expression was found increased in cancer cell lines in hypoxic conditions, and liver of mice treated with CoCl₂, an inductor of hypoxia-like responses (Saarikoski et al., 2002). Also, staining of lipid droplets was found in highly hypoxic cells located at the periphery of necrotic areas of intracerebral glioma (Zoula et al., 2003). HIF-1 transcription factor has a direct role in the accumulation of lipid droplets by mediating lipin-1 expression, an enzyme that catalyzes the conversion of phosphatidic acid into diacylglycerol in the penultimate step of triglyceride synthesis (Mylonis et al., 2012), and HIG2 expression, whose overexpression in normoxia was able to induce intracellular accumulation of neutral lipids in HeLa cells (Gimm et al., 2010).

It was until recently that the contribution of fatty acid uptake and lipid storage to cell growth and survival during hypoxia-reoxygenation in cancer has been demonstrated. Bensaad and collaborators performed an analysis of possible genes induced by antiangiogenic therapy in a mouse xenograft model of glioblastoma, revealing an upregulation of genes involved in fatty acid uptake and transport (Bensaad et al., 2014). In particular, FABP3 and FABP7, genes involved in fatty acid uptake, showed some of the highest fold changes (Bensaad et al., 2014). Moreover, hypoxia induced lipid droplets accumulation in a HIF-1 α -dependent way due to the fact of increased fatty acid uptake, but not de novo lipid synthesis, and FABP3, FABP7, and ADRP were essential for the formation of lipid droplets under hypoxic conditions (Bensaad et al., 2014). According to the authors, these data suggest that lipid droplets accumulation is an adaptive response to hypoxic conditions and could play an important role in cell survival. In fact, disruption of FABP3, FABP7, or ADRP expression reduced ATP production via β -oxidation in a cell-type-dependent manner and increased ROS levels in hypoxia and hypoxia-regeneration conditions, which were accompanied by a decrease in cell growth and survival in vitro. Moreover, FABP3 and FABP7 knockdown impaired in vivo growth of glioblastoma tumor xenographs (Bensaad et al., 2014). Based on these results, it is suggested that the use of antiangiogenic therapies in clinic, that would create a hypoxic environment where lipid droplets induction would be critical for tumor cells

survival, should be combined with fatty acid oxidation and/or glycogen metabolism inhibitors, thus resulting in increased lethality.

3. CONCLUDING REMARKS

Although in the past the presence of cytoplasmic lipid droplets was solely implicated in storage and lipid trafficking, it is currently recognized that these organelles may partake in several cellular functions through a variety of mechanisms. Consequently, this draws attention to a potential role of lipid droplets during the development of different pathological conditions, wherein the intricate regulation of lipid droplets could be targeted for drug development or their increased biogenesis inspected as a potential biomarker for diseases. Still, to a great extent these mechanisms are not yet fully elucidated. Throughout this review, we discussed some features that involve lipid droplets in cancer establishment, pointing out recent evidences that associate these organelles with some of the currently accepted Hallmarks of Cancer. Moreover, proteomic studies have revealed a diverse array of lipid droplets-associated proteins that may differ according to the cell type and cellular activation state, and thus may determine different cellular functions for these organelles. Naturally, the variation in lipid content of lipid droplets must be accounted for their function as well, and this is endorsed by the importance of lipid composition dynamics occurring during cellular division, as discussed previously in this review. Nevertheless, it will be of great interest the development of selective lipid droplet inhibitors to address still open questions of fundamental importance to determine a causal relationship between these organelles and tumorigenesis. Firstly, how important is lipid droplets biogenesis or lipid metabolism during the distinct phases of tumor development? As discussed above, lipid droplets may have a role during either the initial tumor establishment, by converging mitogenic signaling pathways and providing arising cancer cells with pro-inflammatory signaling molecules, or during more advanced cancerous stages, protecting cells from increased ROS levels during hypoxia reprogramming and providing energy and biomass to highly proliferative cells. Secondly, why is lipid droplets accumulation or PAT proteins expression in cancer an event that seems to be cell and tissue-specific? It would be worthy to evaluate if these lipid-rich cancer cells have comparable metabolic pathways assisting cellular transformation. Several lipid-related molecules, such as members of FABP family, or lipolytic enzymes such as ATGL and MAGL, as well as the aforementioned PAT proteins, may therefore be suitable candidates for anti-cancer therapies.

4. REFERENCES

- Accioly, MT, Pacheco, P, Maya-Monteiro, CM, Carrossini, N, Robbs, BK, Oliveira, SS, Kaufmann, C, Morgado-Diaz, JA, Bozza, PT and Viola, JP (2008). "Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells." *Cancer Res* **68**(6): 1732-40.
- Ambrosio, MR, Piccaluga, PP, Ponzoni, M, Rocca, BJ, Malagnino, V, Onorati, M, De Falco, G, Calbi, V, Ogwang, M, Naresh, KN, Pileri, SA, Doglioni, C, Leoncini, L and Lazzi, S (2012). "The alteration of lipid metabolism in Burkitt lymphoma identifies a novel marker: adipophilin." *PLoS One* **7**(8): e44315.

- Andersson, L, Bostrom, P, Ericson, J, Rutberg, M, Magnusson, B, Marchesan, D, Ruiz, M, Asp, L, Huang, P, Frohman, MA, Boren, J and Olofsson, SO (2006). "PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation." *J Cell Sci* **119**(Pt 11): 2246-57.
- Araujo-Santos, T, Prates, DB, Andrade, BB, Nascimento, DO, Clarencio, J, Entringer, PF, Carneiro, AB, Silva-Neto, MA, Miranda, JC, Brodskyn, CI, Barral, A, Bozza, PT and Borges, VM (2010). "Lutzomyia longipalpis saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E(2) production in murine macrophages." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(11): e873.
- Arend, A, Masso, R, Masso, M and Selstam, G (2004). "Electron microscope immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and -2 in pseudopregnant rat corpus luteum during luteolysis." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **74**(1-4): 1-10.
- Atilla-Gokcumen, GE, Muro, E, Relat-Goberna, J, Sasse, S, Bedigian, A, Coughlin, ML, Garcia-Manyes, S and Eggert, US (2014). "Dividing cells regulate their lipid composition and localization." *Cell* **156**(3): 428-39.
- Bandeira-Melo, C, Phoofolo, M and Weller, PF (2001). "Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils." *J Biol Chem* **276**(25): 22779-87.
- Bandeira-Melo, C, Sugiyama, K, Woods, LJ, Phoofolo, M, Center, DM, Cruikshank, WW and Weller, PF (2002). "IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling." *J Immunol* **168**(9): 4756-63.
- Bandeira-Melo, C, Weller, PF and Bozza, PT (2011). "EicosaCell - an immunofluorescent-based assay to localize newly synthesized eicosanoid lipid mediators at intracellular sites." *Methods Mol Biol* **689**: 163-81.
- Bartemes, KR, McKinney, S, Gleich, GJ and Kita, H (1999). "Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG." *J Immunol* **162**(5): 2982-9.
- Bartz, R, Zehmer, JK, Zhu, M, Chen, Y, Serrero, G, Zhao, Y and Liu, P (2007). "Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation." *J Proteome Res* **6**(8): 3256-65.
- Beilstein, F, Bouchoux, J, Rousset, M and Demignot, S (2013). "Proteomic analysis of lipid droplets from Caco-2/TC7 enterocytes identifies novel modulators of lipid secretion." *PLoS One* **8**(1): e53017.
- Bensaad, K, Favaro, E, Lewis, CA, Peck, B, Lord, S, Collins, JM, Pinnick, KE, Wigfield, S, Buffa, FM, Li, JL, Zhang, Q, Wakelam, MJ, Karpe, F, Schulze, A and Harris, AL (2014). "Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1alpha contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation." *Cell Rep* **9**(1): 349-65.
- Bertout, JA, Patel, SA and Simon, MC (2008). "The impact of O₂ availability on human cancer." *Nat Rev Cancer* **8**(12): 967-75.
- Blaner, WS, O'Byrne, SM, Wongsiriroj, N, Kluwe, J, D'Ambrosio, DM, Jiang, H, Schwabe, RF, Hillman, EM, Piantedosi, R and Libien, J (2009). "Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 467-73.
- Blankenberg, FG (2008). "In vivo detection of apoptosis." *J Nucl Med* **49** Suppl 2: 81S-95S.

- Boren, J and Brindle, KM (2012). "Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation." *Cell Death Differ* **19**(9): 1561-70.
- Borojevic, R, Guaragna, RM, Margis, R and Dutra, HS (1990). "In vitro induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX." *In Vitro Cell Dev Biol* **26**(4): 361-8.
- Bostrom, P, Andersson, L, Rutberg, M, Perman, J, Lidberg, U, Johansson, BR, Fernandez-Rodriguez, J, Ericson, J, Nilsson, T, Boren, J and Olofsson, SO (2007). "SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity." *Nat Cell Biol* **9**(11): 1286-93.
- Bostrom, P, Andersson, L, Vind, B, Haversen, L, Rutberg, M, Wickstrom, Y, Larsson, E, Jansson, PA, Svensson, MK, Branemark, R, Ling, C, Beck-Nielsen, H, Boren, J, Hojlund, K and Olofsson, SO (2010). "The SNARE protein SNAP23 and the SNARE-interacting protein Munc18c in human skeletal muscle are implicated in insulin resistance/type 2 diabetes." *Diabetes* **59**(8): 1870-8.
- Bouchoux, J, Beilstein, F, Pauquai, T, Guerrera, IC, Chateau, D, Ly, N, Alqub, M, Klein, C, Chambaz, J, Rousset, M, Lacorte, JM, Morel, E and Demignot, S (2011). "The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated Caco-2/TC7 enterocytes reveals cell-specific characteristics." *Biol Cell* **103**(11): 499-517.
- Boussahmain, C, Mochel, MC and Hoang, MP (2013). "Perilipin and adipophilin expression in sebaceous carcinoma and mimics." *Hum Pathol* **44**(9): 1811-6.
- Bozza, PT, Payne, JL, Goulet, JL and Weller, PF (1996). "Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids." *J Exp Med* **183**(4): 1515-25.
- Bozza, PT, Payne, JL, Morham, SG, Langenbach, R, Smithies, O and Weller, PF (1996). "Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 11091-6.
- Bozza, PT, Yu, W, Penrose, JF, Morgan, ES, Dvorak, AM and Weller, PF (1997). "Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation." *J Exp Med* **186**(6): 909-20.
- Bozza, PT, Yu, W, Cassara, J and Weller, PF (1998). "Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects." *J Leukoc Biol* **64**(4): 563-9.
- Bozza, PT and Weller, PF (2001). "Arachidonyl trifluoromethyl ketone induces lipid body formation in leukocytes." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **64**(4-5): 227-30.
- Bozza, PT, Magalhaes, KG and Weller, PF (2009). "Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 540-51.
- Bozza, PT and Viola, JP (2010). "Lipid droplets in inflammation and cancer." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **82**(4-6): 243-50.
- Bozza, PT, Bakker-Abreu, I, Navarro-Xavier, RA and Bandeira-Melo, C (2011). "Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **85**(5): 205-13.
- Brasaemle, DL (2006). "Cell biology. A metabolic push to proliferate." *Science* **313**(5793): 1581-2.
- Brasaemle, DL and Wolins, NE (2012). "Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion." *J Biol Chem* **287**(4): 2273-9.

- Brown, DA (2001). "Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat." *Curr Biol* **11**(11): R446-9.
- Callies, R, Sri-Pathmanathan, RM, Ferguson, DY and Brindle, KM (1993). "The appearance of neutral lipid signals in the 1H NMR spectra of a myeloma cell line correlates with the induced formation of cytoplasmic lipid droplets." *Magn Reson Med* **29**(4): 546-50.
- Cardona, PJ, Llatjos, R, Gordillo, S, Diaz, J, Ojanguren, I, Ariza, A and Ausina, V (2000). "Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with Mycobacterium tuberculosis." *Scand J Immunol* **52**(2): 156-63.
- Chang, BH, Li, L, Paul, A, Taniguchi, S, Nannegari, V, Heird, WC and Chan, L (2006). "Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein." *Mol Cell Biol* **26**(3): 1063-76.
- Chawla, A, Repa, JJ, Evans, RM and Mangelsdorf, DJ (2001). "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files." *Science* **294**(5548): 1866-70.
- Chen, JS, Greenberg, AS and Wang, SM (2002). "Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages." *J Cell Biochem* **86**(4): 784-91.
- Cho, SY, Shin, ES, Park, PJ, Shin, DW, Chang, HK, Kim, D, Lee, HH, Lee, JH, Kim, SH, Song, MJ, Chang, IS, Lee, OS and Lee, TR (2007). "Identification of mouse Prp19p as a lipid droplet-associated protein and its possible involvement in the biogenesis of lipid droplets." *J Biol Chem* **282**(4): 2456-65.
- Choi, SE, Jung, IR, Lee, YJ, Lee, SJ, Lee, JH, Kim, Y, Jun, HS, Lee, KW, Park, CB and Kang, Y (2011). "Stimulation of lipogenesis as well as fatty acid oxidation protects against palmitate-induced INS-1 beta-cell death." *Endocrinology* **152**(3): 816-27.
- Chung, S, Brown, JM, Sandberg, MB and McIntosh, M (2005). "Trans-10,cis-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signaling." *J Lipid Res* **46**(5): 885-95.
- Cohen, AW, Razani, B, Schubert, W, Williams, TM, Wang, XB, Iyengar, P, Brasaemle, DL, Scherer, PE and Lisanti, MP (2004). "Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation." *Diabetes* **53**(5): 1261-70.
- Das, SK, Eder, S, Schauer, S, Diwoky, C, Temmel, H, Guerl, B, Gorkiewicz, G, Tamilarasan, KP, Kumari, P, Trauner, M, Zimmermann, R, Vesely, P, Haemmerle, G, Zechner, R and Hoefler, G (2011). "Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia." *Science* **333**(6039): 233-8.
- D'Avila, H, Melo, RC, Parreira, GG, Werneck-Barroso, E, Castro-Faria-Neto, HC and Bozza, PT (2006). "Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo." *J Immunol* **176**(5): 3087-97.
- de Assis, EF, Silva, AR, Caiado, LF, Marathe, GK, Zimmerman, GA, Prescott, SM, McIntyre, TM, Bozza, PT and de Castro-Faria-Neto, HC (2003). "Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes." *J Immunol* **171**(4): 2090-8.
- Deans, C and Wigmore, SJ (2005). "Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**(3): 265-9.
- Dvorak, AM, Dvorak, HF, Peters, SP, Shulman, ES, MacGlashan, DW, Jr., Pyne, K, Harvey, VS, Galli, SJ and Lichtenstein, LM (1983). "Lipid bodies:

- cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells." *J Immunol* **131**(6): 2965-76.
- Dvorak, AM, Morgan, E, Schleimer, RP, Ryeom, SW, Lichtenstein, LM and Weller, PF (1992). "Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils." *J Histochem Cytochem* **40**(6): 759-69.
- Dvorak, AM, Weller, PF, Harvey, VS, Morgan, ES and Dvorak, HF (1993). "Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies." *Int Arch Allergy Immunol* **101**(2): 136-42.
- Dvorak, AM, Morgan, ES, Tzizik, DM and Weller, PF (1994). "Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblasts." *Int Arch Allergy Immunol* **105**(3): 245-50.
- Dvorak, AM, Morgan, ES and Weller, PF (2003). "RNA is closely associated with human mast cell lipid bodies." *Histol Histopathol* **18**(3): 943-68.
- Dvorak, AM (2005). "Mast cell secretory granules and lipid bodies contain the necessary machinery important for the *in situ* synthesis of proteins." *Chem Immunol Allergy* **85**: 252-315.
- Fearon, KC and Moses, AG (2002). "Cancer cachexia." *Int J Cardiol* **85**(1): 73-81.
- Fei, W, Shui, G, Gaeta, B, Du, X, Kuerschner, L, Li, P, Brown, AJ, Wenk, MR, Parton, RG and Yang, H (2008). "Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast." *J Cell Biol* **180**(3): 473-82.
- Fernandez, MA, Albor, C, Ingelmo-Torres, M, Nixon, SJ, Ferguson, C, Kurzchalia, T, Tebar, F, Enrich, C, Parton, RG and Pol, A (2006). "Caveolin-1 is essential for liver regeneration." *Science* **313**(5793): 1628-32.
- Friedman, SL (2008). "Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver." *Physiol Rev* **88**(1): 125-72.
- Fujimoto, T, Kogo, H, Ishiguro, K, Tauchi, K and Nomura, R (2001). "Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell." *J Cell Biol* **152**(5): 1079-85.
- Fujimoto, Y, Itabe, H, Kinoshita, T, Homma, KJ, Onoduka, J, Mori, M, Yamaguchi, S, Makita, M, Higashi, Y, Yamashita, A and Takano, T (2007). "Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7." *J Lipid Res* **48**(6): 1280-92.
- Furuta, E, Pai, SK, Zhan, R, Bandyopadhyay, S, Watabe, M, Mo, YY, Hirota, S, Hosobe, S, Tsukada, T, Miura, K, Kamada, S, Saito, K, Iiizumi, M, Liu, W, Ericsson, J and Watabe, K (2008). "Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1." *Cancer Res* **68**(4): 1003-11.
- Gearing, KL, Gottlicher, M, Teboul, M, Widmark, E and Gustafsson, JA (1993). "Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4): 1440-4.
- Ghosh, M, Tucker, DE, Burchett, SA and Leslie, CC (2006). "Properties of the Group IV phospholipase A2 family." *Prog Lipid Res* **45**(6): 487-510.
- Gimm, T, Wiese, M, Teschemacher, B, Deggerich, A, Schodel, J, Knaup, KX, Hackenbeck, T, Hellerbrand, C, Amann, K, Wiesener, MS, Honing, S, Eckardt,

- KU and Warnecke, C (2010). "Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1." *Faseb J* **24**(11): 4443-58.
- Gomes, AF, Magalhaes, KG, Rodrigues, RM, de Carvalho, L, Molinaro, R, Bozza, PT and Barbosa, HS (2014). "Toxoplasma gondii-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN-g and PGE2." *Parasit Vectors* **7**: 47.
- Gross, DN, Miyoshi, H, Hosaka, T, Zhang, HH, Pino, EC, Souza, S, Obin, M, Greenberg, AS and Pilch, PF (2006). "Dynamics of lipid droplet-associated proteins during hormonally stimulated lipolysis in engineered adipocytes: stabilization and lipid droplet binding of adipocyte differentiation-related protein/adipophilin." *Mol Endocrinol* **20**(2): 459-66.
- Guan, B, Wang, H, Cao, S, Rao, Q, Wang, Y, Zhu, Y, Shi, Q, Yin, H, Wang, X and Zhou, X (2011). "Lipid-rich carcinoma of the breast clinicopathologic analysis of 17 cases." *Ann Diagn Pathol* **15**(4): 225-32.
- Guaragna, RM, Trugo, L and Borojevic, R (1991). "Neutral lipid synthesis and accumulation during in vitro induction of the lipocyte phenotype in hepatic connective tissue cells." *Biochim Biophys Acta* **1085**(1): 29-34.
- Gubern, A, Casas, J, Barcelo-Torns, M, Barneda, D, de la Rosa, X, Masgrau, R, Picatoste, F, Balsinde, J, Balboa, MA and Claro, E (2008). "Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets." *J Biol Chem* **283**(41): 27369-82.
- Gubern, A, Barcelo-Torns, M, Barneda, D, Lopez, JM, Masgrau, R, Picatoste, F, Chalfant, CE, Balsinde, J, Balboa, MA and Claro, E (2009). "JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A2." *J Biol Chem* **284**(47): 32359-69.
- Guo, Y, Cordes, KR, Farese, RV, Jr. and Walther, TC (2009). "Lipid droplets at a glance." *J Cell Sci* **122**(Pt 6): 749-52.
- Hakumaki, JM, Poptani, H, Sandmair, AM, Yla-Herttuala, S and Kauppinen, RA (1999). "1H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis." *Nat Med* **5**(11): 1323-7.
- Hakumaki, JM and Kauppinen, RA (2000). "1H NMR visible lipids in the life and death of cells." *Trends Biochem Sci* **25**(8): 357-62.
- Hanahan, D and Folkman, J (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* **86**(3): 353-64.
- Hanahan, D and Weinberg, RA (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-74.
- Henique, C, Mansouri, A, Fumey, G, Lenoir, V, Girard, J, Bouillaud, F, Pripl-Buus, C and Cohen, I (2010). "Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis." *J Biol Chem* **285**(47): 36818-27.
- Hernandez-Pando, R, Pavon, L, Arriaga, K, Orozco, H, Madrid-Marina, V and Rook, G (1997). "Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection." *Infect Immun* **65**(8): 3317-27.
- Hodges, BD and Wu, CC (2010). "Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets." *J Lipid Res* **51**(2): 262-73.
- Holm, S, Ueland, T, Dahl, TB, Michelsen, AE, Skjelland, M, Russell, D, Nymo, SH, Krohg-Sorensen, K, Clausen, OP, Atar, D, Januzzi, JL, Aukrust, P, Jensen,

- JK and Halvorsen, B (2011). "Fatty Acid binding protein 4 is associated with carotid atherosclerosis and outcome in patients with acute ischemic stroke." *PLoS One* **6**(12): e28785.
- Horton, JD (2002). "Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis." *Biochem Soc Trans* **30**(Pt 6): 1091-5.
- Inazawa, Y, Nakatsu, M, Yasugi, E, Saeki, K and Yuo, A (2003). "Lipid droplet formation in human myeloid NB4 cells stimulated by all trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor: possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Cell Struct Funct* **28**(5): 487-93.
- Kaelin, WG, Jr. and Ratcliffe, PJ (2008). "Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway." *Mol Cell* **30**(4): 393-402.
- Keller, H, Dreyer, C, Medin, J, Mahfoudi, A, Ozato, K and Wahli, W (1993). "Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(6): 2160-4.
- Khor, VK, Ahrends, R, Lin, Y, Shen, WJ, Adams, CM, Roseman, AN, Cortez, Y, Teruel, MN, Azhar, S and Kraemer, FB (2014). "The proteome of cholesteryl-ester-enriched versus triacylglycerol-enriched lipid droplets." *PLoS One* **9**(8): e105047.
- Kim, SC, Chen, Y, Mirza, S, Xu, Y, Lee, J, Liu, P and Zhao, Y (2006). "A clean, more efficient method for in-solution digestion of protein mixtures without detergent or urea." *J Proteome Res* **5**(12): 3446-52.
- Kimmel, AR, Brasaemle, DL, McAndrews-Hill, M, Sztalryd, C and Londos, C (2010). "Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins." *J Lipid Res* **51**(3): 468-71.
- Kohjima, M, Tsai, TH, Tackett, BC, Thevananther, S, Li, L, Chang, BH and Chan, L (2013). "Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adipose differentiation related protein-null mice." *J Hepatol* **59**(6): 1246-54.
- Krishnan, J, Suter, M, Windak, R, Krebs, T, Felley, A, Montessuit, C, Tokarska-Schlattner, M, Aasum, E, Bogdanova, A, Perriard, E, Perriard, JC, Larsen, T, Pedrazzini, T and Krek, W (2009). "Activation of a HIF1alpha-PPARgamma axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy." *Cell Metab* **9**(6): 512-24.
- Kuhajda, FP (2006). "Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway." *Cancer Res* **66**(12): 5977-80.
- Kurat, CF, Wolinski, H, Petschnigg, J, Kaluarachchi, S, Andrews, B, Natter, K and Kohlwein, SD (2009). "Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression." *Mol Cell* **33**(1): 53-63.
- Kurokawa, Y, Matoba, R, Nakamori, S, Takemasa, I, Nagano, H, Dono, K, Umehita, K, Sakon, M, Monden, M and Kato, K (2004). "PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma." *J Exp Clin Cancer Res* **23**(1): 135-41.
- Larigauderie, G, Furman, C, Jaye, M, Lasselin, C, Copin, C, Fruchart, JC, Castro, G and Rouis, M (2004). "Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(3): 504-10.
- Larigauderie, G, Cuaz-Perolin, C, Younes, AB, Furman, C, Lasselin, C, Copin, C, Jaye, M, Fruchart, JC and Rouis, M (2006). "Adipophilin increases

- triglyceride storage in human macrophages by stimulation of biosynthesis and inhibition of beta-oxidation." *Febs J* **273**(15): 3498-510.
- Larsson, S, Resjo, S, Gomez, MF, James, P and Holm, C (2012). "Characterization of the lipid droplet proteome of a clonal insulin-producing beta-cell line (INS-1 832/13)." *J Proteome Res* **11**(2): 1264-73.
- Leung, JK, Cases, S and Vu, TH (2008). "P311 functions in an alternative pathway of lipid accumulation that is induced by retinoic acid." *J Cell Sci* **121**(Pt 16): 2751-8.
- Li, AC and Glass, CK (2002). "The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention." *Nat Med* **8**(11): 1235-42.
- Liu, P, Ying, Y, Zhao, Y, Mundy, DI, Zhu, M and Anderson, RG (2004). "Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic." *J Biol Chem* **279**(5): 3787-92.
- Long, AP, Manneschmidt, AK, VerBrugge, B, Dortch, MR, Minkin, SC, Prater, KE, Biggerstaff, JP, Dunlap, JR and Dalheimer, P (2012). "Lipid droplet de novo formation and fission are linked to the cell cycle in fission yeast." *Traffic* **13**(5): 705-14.
- Makowski, L, Brittingham, KC, Reynolds, JM, Suttles, J and Hotamisligil, GS (2005). "The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities." *J Biol Chem* **280**(13): 12888-95.
- Mariano, FV, dos Santos, HT, Azanero, WD, da Cunha, IW, Coutinho-Camilo, CM, de Almeida, OP, Kowalski, LP and Altemani, A (2013). "Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands is a lipid-rich tumour, and adipophilin can be valuable in its identification." *Histopathology* **63**(4): 558-67.
- Martin, S and Parton, RG (2005). "Caveolin, cholesterol, and lipid bodies." *Semin Cell Dev Biol* **16**(2): 163-74.
- Martin, S and Parton, RG (2006). "Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(5): 373-8.
- Martinez-Outschoorn, UE, Whitaker-Menezes, D, Pavlides, S, Chiavarina, B, Bonuccelli, G, Casey, T, Tsirigos, A, Migneco, G, Witkiewicz, A, Balliet, R, Mercier, I, Wang, C, Flomenberg, N, Howell, A, Lin, Z, Caro, J, Pestell, RG, Sotgia, F and Lisanti, MP (2010). "The autophagic tumor stroma model of cancer or "battery-operated tumor growth": A simple solution to the autophagy paradox." *Cell Cycle* **9**(21): 4297-306.
- Matsubara, J, Honda, K, Ono, M, Sekine, S, Tanaka, Y, Kobayashi, M, Jung, G, Sakuma, T, Nakamori, S, Sata, N, Nagai, H, Ioka, T, Okusaka, T, Kosuge, T, Tsuchida, A, Shimahara, M, Yasunami, Y, Chiba, T and Yamada, T (2011). "Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**(10): 2195-203.
- Maya-Monteiro, CM, Almeida, PE, D'Avila, H, Martins, AS, Rezende, AP, Castro-Faria-Neto, H and Bozza, PT (2008). "Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism." *J Biol Chem* **283**(4): 2203-10.
- Maya-Monteiro, CM and Bozza, PT (2008). "Leptin and mTOR: partners in metabolism and inflammation." *Cell Cycle* **7**(12): 1713-7.
- Meadows, JW, Pitzer, B, Brockman, DE and Myatt, L (2005). "Expression and localization of adipophilin and perilipin in human fetal membranes: association

- with lipid bodies and enzymes involved in prostaglandin synthesis." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(4): 2344-50.
- Mellick, AS, Day, CJ, Weinstein, SR, Griffiths, LR and Morrison, NA (2002). "Differential gene expression in breast cancer cell lines and stroma-tumor differences in microdissected breast cancer biopsies revealed by display array analysis." *Int J Cancer* **100**(2): 172-80.
- Melo, RC, D'Avila, H, Fabrino, DL, Almeida, PE and Bozza, PT (2003). "Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection." *Tissue Cell* **35**(1): 59-67.
- Melo, RC, D'Avila, H, Wan, HC, Bozza, PT, Dvorak, AM and Weller, PF (2011). "Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques." *J Histochem Cytochem* **59**(5): 540-56.
- Menendez, JA and Lupu, R (2007). "Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis." *Nat Rev Cancer* **7**(10): 763-77.
- Metallo, CM, Gameiro, PA, Bell, EL, Mattaini, KR, Yang, J, Hiller, K, Jewell, CM, Johnson, ZR, Irvine, DJ, Guarente, L, Kelleher, JK, Vander Heiden, MG, Iliopoulos, O and Stephanopoulos, G (2011). "Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia." *Nature* **481**(7381): 380-4.
- Milman, T, Schear, MJ and Eagle, RC, Jr. (2014). "Diagnostic utility of adipophilin immunostain in periocular carcinomas." *Ophthalmology* **121**(4): 964-71.
- Moessinger, C, Kuerschner, L, Spandl, J, Shevchenko, A and Thiele, C (2011). "Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine." *J Biol Chem* **286**(24): 21330-9.
- Moreira, LS, Piva, B, Gentile, LB, Mesquita-Santos, FP, D'Avila, H, Maya-Monteiro, CM, Bozza, PT, Bandeira-Melo, C and Diaz, BL (2009). "Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells." *Biochim Biophys Acta* **1791**(3): 156-65.
- Moritani, S, Ichihara, S, Hasegawa, M, Endo, T, Oiwa, M, Shiraiwa, M, Nishida, C, Morita, T, Sato, Y, Hayashi, T and Kato, A (2011). "Intracytoplasmic lipid accumulation in apocrine carcinoma of the breast evaluated with adipophilin immunoreactivity: a possible link between apocrine carcinoma and lipid-rich carcinoma." *Am J Surg Pathol* **35**(6): 861-7.
- Mullen, AR, Wheaton, WW, Jin, ES, Chen, PH, Sullivan, LB, Cheng, T, Yang, Y, Linehan, WM, Chandel, NS and DeBerardinis, RJ (2011). "Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria." *Nature* **481**(7381): 385-8.
- Murphy, DJ (2001). "The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms." *Prog Lipid Res* **40**(5): 325-438.
- Muthusamy, K, Halbert, G and Roberts, F (2006). "Immunohistochemical staining for adipophilin, perilipin and TIP47." *J Clin Pathol* **59**(11): 1166-70.
- Mylonis, I, Sembongi, H, Befani, C, Liakos, P, Siniossoglou, S and Simos, G (2012). "Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression." *J Cell Sci* **125**(Pt 14): 3485-93.
- Nagy, L, Tontonoz, P, Alvarez, JG, Chen, H and Evans, RM (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma." *Cell* **93**(2): 229-40.

- Nieman, KM, Kenny, HA, Penicka, CV, Ladanyi, A, Buell-Gutbrod, R, Zillhardt, MR, Romero, IL, Carey, MS, Mills, GB, Hotamisligil, GS, Yamada, SD, Peter, ME, Gwin, K and Lengyel, E (2011). "Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth." *Nat Med* **17**(11): 1498-503.
- Nishino, N, Tamori, Y, Tateya, S, Kawaguchi, T, Shibakusa, T, Mizunoya, W, Inoue, K, Kitazawa, R, Kitazawa, S, Matsuki, Y, Hiramatsu, R, Masubuchi, S, Omachi, A, Kimura, K, Saito, M, Amo, T, Ohta, S, Yamaguchi, T, Osumi, T, Cheng, J, Fujimoto, T, Nakao, H, Nakao, K, Aiba, A, Okamura, H, Fushiki, T and Kasuga, M (2008). "FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets." *J Clin Invest* **118**(8): 2808-21.
- Nishiyama, Y, Goda, N, Kanai, M, Niwa, D, Osanai, K, Yamamoto, Y, Senoo-Matsuda, N, Johnson, RS, Miura, S, Kabe, Y and Suematsu, M (2012). "HIF-1alpha induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice." *J Hepatol* **56**(2): 441-7.
- Nomura, DK, Long, JZ, Niessen, S, Hoover, HS, Ng, SW and Cravatt, BF (2010). "Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis." *Cell* **140**(1): 49-61.
- Olofsson, SO, Bostrom, P, Andersson, L, Rutberg, M, Perman, J and Boren, J (2009). "Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 448-58.
- Opstad, KS, Bell, BA, Griffiths, JR and Howe, FA (2008). "An investigation of human brain tumour lipids by high-resolution magic angle spinning ¹H MRS and histological analysis." *NMR Biomed* **21**(7): 677-85.
- Ostler, DA, Prieto, VG, Reed, JA, Deavers, MT, Lazar, AJ and Ivan, D (2010). "Adipophilin expression in sebaceous tumors and other cutaneous lesions with clear cell histology: an immunohistochemical study of 117 cases." *Mod Pathol* **23**(4): 567-73.
- Pacheco, P, Bozza, FA, Gomes, RN, Bozza, M, Weller, PF, Castro-Faria-Neto, HC and Bozza, PT (2002). "Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism." *J Immunol* **169**(11): 6498-506.
- Pacheco, P, Vieira-de-Abreu, A, Gomes, RN, Barbosa-Lima, G, Wermelinger, LB, Maya-Monteiro, CM, Silva, AR, Bozza, MT, Castro-Faria-Neto, HC, Bandeira-Melo, C and Bozza, PT (2007). "Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B₄-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response." *J Immunol* **179**(12): 8500-8.
- Paiva, LA, Maya-Monteiro, CM, Bandeira-Melo, C, Silva, PM, El-Cheikh, MC, Teodoro, AJ, Borojevic, R, Perez, SA and Bozza, PT (2010). "Interplay of cysteinyl leukotrienes and TGF-beta in the activation of hepatic stellate cells from Schistosoma mansoni granulomas." *Biochim Biophys Acta* **1801**(12): 1341-8.
- Paul, A, Chang, BH, Li, L, Yechoor, VK and Chan, L (2008). "Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis." *Circ Res* **102**(12): 1492-501.
- Pavlides, S, Whitaker-Menezes, D, Castello-Cros, R, Flomenberg, N, Witkiewicz, AK, Frank, PG, Casimiro, MC, Wang, C, Fortina, P, Addya, S, Pestell, RG, Martinez-Outschoorn, UE, Sotgia, F and Lisanti, MP (2009). "The

- reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma." *Cell Cycle* **8**(23): 3984-4001.
- Picco, R, Tomasella, A, Fogolari, F and Brancolini, C (2014). "Transcriptomic analysis unveils correlations between regulative apoptotic caspases and genes of cholesterol homeostasis in human brain." *PLoS One* **9**(10): e110610.
- Piris, A, Peng, Y, Boussahmain, C, Essary, LR, Gudewicz, TM and Hoang, MP (2014). "Cutaneous and mammary apocrine carcinomas have different immunoprofiles." *Hum Pathol* **45**(2): 320-6.
- Ploegh, HL (2007). "A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum." *Nature* **448**(7152): 435-8.
- Plotkowski, MC, Brandao, BA, de Assis, MC, Feliciano, LF, Raymond, B, Freitas, C, Saliba, AM, Zahm, JM, Touqui, L and Bozza, PT (2008). "Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells." *Microb Pathog* **45**(1): 30-7.
- Pol, A, Luetterforst, R, Lindsay, M, Heino, S, Ikonen, E and Parton, RG (2001). "A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance." *J Cell Biol* **152**(5): 1057-70.
- Puri, V, Konda, S, Ranjit, S, Aouadi, M, Chawla, A, Chouinard, M, Chakladar, A and Czech, MP (2007). "Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage." *J Biol Chem* **282**(47): 34213-8.
- Rae, FK, Stephenson, SA, Nicol, DL and Clements, JA (2000). "Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display." *Int J Cancer* **88**(5): 726-32.
- Ridley, DS and Ridley, MJ (1987). "Rationale for the histological spectrum of tuberculosis. A basis for classification." *Pathology* **19**(2): 186-92.
- Robenek, MJ, Severs, NJ, Schlattmann, K, Plenz, G, Zimmer, KP, Troyer, D and Robenek, H (2004). "Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis." *Faseb J* **18**(7): 866-8.
- Robenek, H, Lorkowski, S, Schnoor, M and Troyer, D (2005). "Spatial integration of TIP47 and adipophilin in macrophage lipid bodies." *J Biol Chem* **280**(7): 5789-94.
- Robenek, H, Hofnagel, O, Buers, I, Robenek, MJ, Troyer, D and Severs, NJ (2006). "Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis." *J Cell Sci* **119**(Pt 20): 4215-24.
- Ross, R (1995). "Cell biology of atherosclerosis." *Annu Rev Physiol* **57**: 791-804.
- Roulin, K, Hagens, G, Hotz, R, Saurat, JH, Veerkamp, JH and Siegenthaler, G (1999). "The fatty acid-binding heterocomplex FA-p34 formed by S100A8 and S100A9 is the major fatty acid carrier in neutrophils and translocates from the cytosol to the membrane upon stimulation." *Exp Cell Res* **247**(2): 410-21.
- Saarikoski, ST, Rivera, SP and Hankinson, O (2002). "Mitogen-inducible gene 6 (MIG-6), adipophilin and tuftelin are inducible by hypoxia." *FEBS Lett* **530**(1-3): 186-90.
- Saka, HA and Valdivia, R (2012). "Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions." *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 411-37.
- Santos, CR and Schulze, A (2012). "Lipid metabolism in cancer." *Febs J* **279**(15): 2610-23.
- Sato, S, Fukasawa, M, Yamakawa, Y, Natsume, T, Suzuki, T, Shoji, I, Aizaki, H, Miyamura, T and Nishijima, M (2006). "Proteomic profiling of lipid droplet

- proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein." *J Biochem* **139**(5): 921-30.
- Scarfo, LM, Weller, PF and Farber, HW (2001). "Induction of endothelial cell cytoplasmic lipid bodies during hypoxia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(1): H294-301.
- Schaloske, RH and Dennis, EA (2006). "The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system." *Biochim Biophys Acta* **1761**(11): 1246-59.
- Schmitz, G and Grandl, M (2008). "Lipid homeostasis in macrophages - implications for atherosclerosis." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **160**: 93-125.
- Seachord, CL, VandeVoort, CA and Duffy, DM (2005). "Adipose differentiation-related protein: a gonadotropin- and prostaglandin-regulated protein in primate periovulatory follicles." *Biol Reprod* **72**(6): 1305-14.
- Shao, W and Espenshade, PJ (2012). "Expanding roles for SREBP in metabolism." *Cell Metab* **16**(4): 414-9.
- Shen, GM, Zhao, YZ, Chen, MT, Zhang, FL, Liu, XL, Wang, Y, Liu, CZ, Yu, J and Zhang, JW (2012). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes LDL and VLDL uptake through inducing VLDLR under hypoxia." *Biochem J* **441**(2): 675-83.
- Silva, AR, de Assis, EF, Caiado, LF, Marathe, GK, Bozza, MT, McIntyre, TM, Zimmerman, GA, Prescott, SM, Bozza, PT and Castro-Faria-Neto, HC (2002). "Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein." *J Immunol* **168**(8): 4112-20.
- Silva, AR, Pacheco, P, Vieira-de-Abreu, A, Maya-Monteiro, CM, D'Alegria, B, Magalhaes, KG, de Assis, EF, Bandeira-Melo, C, Castro-Faria-Neto, HC and Bozza, PT (2009). "Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon." *Biochim Biophys Acta* **1791**(11): 1066-75.
- Six, DA and Dennis, EA (2000). "The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization." *Biochim Biophys Acta* **1488**(1-2): 1-19.
- Sorger, D and Daum, G (2002). "Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **184**(2): 519-24.
- Sorgi, CA, Secatto, A, Fontanari, C, Turato, WM, Belanger, C, de Medeiros, AI, Kashima, S, Marleau, S, Covas, DT, Bozza, PT and Faccioli, LH (2009). "Histoplasma capsulatum cell wall β -glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection." *J Immunol* **182**(7): 4025-35.
- Souza, SC, Muliro, KV, Liscum, L, Lien, P, Yamamoto, MT, Schaffer, JE, Dallal, GE, Wang, X, Kraemer, FB, Obin, M and Greenberg, AS (2002). "Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system." *J Biol Chem* **277**(10): 8267-72.
- Straub, BK, Herpel, E, Singer, S, Zimbelmann, R, Breuhahn, K, Macher-Goeppinger, S, Warth, A, Lehmann-Koch, J, Longerich, T, Heid, H and Schirmacher, P (2010). "Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis." *Mod Pathol* **23**(3): 480-92.

- Sun, RC and Denko, NC (2014). "Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth." *Cell Metab* **19**(2): 285-92.
- Swinnen, JV, Brusselmans, K and Verhoeven, G (2006). "Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**(4): 358-65.
- Szigeti, A, Minik, O, Hocsak, E, Pozsgai, E, Boronkai, A, Farkas, R, Balint, A, Bodis, J, Sumegi, B and Bellyei, S (2009). "Preliminary study of TIP47 as a possible new biomarker of cervical dysplasia and invasive carcinoma." *Anticancer Res* **29**(2): 717-24.
- Szymanski, KM, Binns, D, Bartz, R, Grishin, NV, Li, WP, Agarwal, AK, Garg, A, Anderson, RG and Goodman, JM (2007). "The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(52): 20890-5.
- Tauchi-Sato, K, Ozeki, S, Houjou, T, Taguchi, R and Fujimoto, T (2002). "The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition." *J Biol Chem* **277**(46): 44507-12.
- Than, NG, Sumegi, B, Bellyei, S, Berki, T, Szekeres, G, Janaky, T, Szigeti, A, Bohn, H and Than, GN (2003). "Lipid droplet and milk lipid globule membrane associated placental protein 17b (PP17b) is involved in apoptotic and differentiation processes of human epithelial cervical carcinoma cells." *Eur J Biochem* **270**(6): 1176-88.
- Tisdale, MJ (2002). "Cachexia in cancer patients." *Nat Rev Cancer* **2**(11): 862-71.
- Tontonoz, P, Nagy, L, Alvarez, JG, Thomazy, VA and Evans, RM (1998). "PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL." *Cell* **93**(2): 241-52.
- Triggiani, M, Oriente, A, Seeds, MC, Bass, DA, Marone, G and Chilton, FH (1995). "Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool." *J Exp Med* **182**(5): 1181-90.
- Ueo, T, Yonemasu, H, Yada, N, Yano, S, Ishida, T, Urabe, M, Takahashi, K, Nagamatsu, H, Narita, R, Yao, K, Daa, T and Yokoyama, S (2013). "White opaque substance represents an intracytoplasmic accumulation of lipid droplets: immunohistochemical and immunoelectron microscopic investigation of 26 cases." *Dig Endosc* **25**(2): 147-55.
- Vieira-de-Abreu, A, Amendoeira, FC, Gomes, GS, Zanon, C, Chedier, LM, Figueiredo, MR, Kaplan, MA, Frutuoso, VS, Castro-Faria-Neto, HC, Weller, PF, Bandeira-Melo, C and Bozza, PT (2005). "Anti-allergic properties of the bromeliaceae Nidularium procerum: inhibition of eosinophil activation and influx." *Int Immunopharmacol* **5**(13-14): 1966-74.
- Vieira-de-Abreu, A, Assis, EF, Gomes, GS, Castro-Faria-Neto, HC, Weller, PF, Bandeira-Melo, C and Bozza, PT (2005). "Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils." *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**(3): 254-61.
- Walther, TC and Farese, RV, Jr. (2009). "The life of lipid droplets." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 459-66.
- Wan, HC, Melo, RC, Jin, Z, Dvorak, AM and Weller, PF (2007). "Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies." *Faseb J* **21**(1): 167-78.

- Wang, SM, Hwang, RD, Greenberg, AS and Yeo, HL (2003). "Temporal and spatial assembly of lipid droplet-associated proteins in 3T3-L1 preadipocytes." *Histochem Cell Biol* **120**(4): 285-92.
- Wang, D and Dubois, RN (2010). "Eicosanoids and cancer." *Nat Rev Cancer* **10**(3): 181-93.
- Wang, G, Zhang, X, Lee, JS, Wang, X, Yang, ZQ and Zhang, K (2012). "Endoplasmic reticulum factor ERLIN2 regulates cytosolic lipid content in cancer cells." *Biochem J* **446**(3): 415-25.
- Weibel, GL, Joshi, MR, Wei, C, Bates, SR, Blair, IA and Rothblat, GH (2009). "15(S)-Lipoxygenase-1 associates with neutral lipid droplets in macrophage foam cells: evidence of lipid droplet metabolism." *J Lipid Res* **50**(12): 2371-6.
- Weller, PF, Ackerman, SJ, Nicholson-Weller, A and Dvorak, AM (1989). "Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes." *Am J Pathol* **135**(5): 947-59.
- Weller, PF, Monahan-Earley, RA, Dvorak, HF and Dvorak, AM (1991). "Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation." *Am J Pathol* **138**(1): 141-8.
- Weller, PF, Ryeom, SW, Picard, ST, Ackerman, SJ and Dvorak, AM (1991). "Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C." *J Cell Biol* **113**(1): 137-46.
- Weller, PF, Bozza, PT, Yu, W and Dvorak, AM (1999). "Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation." *Int Arch Allergy Immunol* **118**(2-4): 450-2.
- Wenger, RH (2002). "Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression." *Faseb J* **16**(10): 1151-62.
- Wolins, NE, Brasaemle, DL and Bickel, PE (2006). "A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins." *FEBS Lett* **580**(23): 5484-91.
- Wooten, RE, Willingham, MC, Daniel, LW, Leslie, CC, Rogers, LC, Sergeant, S and O'Flaherty, JT (2008). "Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2alpha fluorescent proteins." *Biochim Biophys Acta* **1783**(8): 1544-50.
- Yao, M, Tabuchi, H, Nagashima, Y, Baba, M, Nakaigawa, N, Ishiguro, H, Hamada, K, Inayama, Y, Kishida, T, Hattori, K, Yamada-Okabe, H and Kubota, Y (2005). "Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma." *J Pathol* **205**(3): 377-87.
- Yao, M, Huang, Y, Shioi, K, Hattori, K, Murakami, T, Nakaigawa, N, Kishida, T, Nagashima, Y and Kubota, Y (2007). "Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma." *Clin Cancer Res* **13**(1): 152-60.
- Yaqoob, P (2003). "Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation." *Trends Immunol* **24**(12): 639-45.
- Yoshii, S, Kato, M, Honma, K, Fujinaga, T, Tsujii, Y, Maekawa, A, Inoue, T, Hayashi, Y, Akasaka, T, Shinzaki, S, Nishida, T, Iijima, H, Tsujii, M, Morii, E and Takehara, T (2014). "Esophageal adenocarcinoma with white opaque substance observed by magnifying endoscopy with narrow band imaging." *Dig Endosc*.
- Yu, W, Bozza, PT, Tzizik, DM, Gray, JP, Cassara, J, Dvorak, AM and Weller, PF (1998). "Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies." *Am J Pathol* **152**(3): 759-69.

- Yu, W, Cassara, J and Weller, PF (2000). "Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells." *Blood* **95**(3): 1078-85.
- Zechner, R, Kienesberger, PC, Haemmerle, G, Zimmermann, R and Lass, A (2009). "Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores." *J Lipid Res* **50**(1): 3-21.
- Zhang, H, Wang, Y, Li, J, Yu, J, Pu, J, Li, L, Zhang, H, Zhang, S, Peng, G, Yang, F and Liu, P (2011). "Proteome of skeletal muscle lipid droplet reveals association with mitochondria and apolipoprotein a-I." *J Proteome Res* **10**(10): 4757-68.
- Zhang, XD, Li, W, Zhang, N, Hou, YL, Niu, ZQ, Zhong, YJ, Zhang, YP and Yang, SY (2014). "Identification of adipophilin as a potential diagnostic tumor marker for lung adenocarcinoma." *Int J Clin Exp Med* **7**(4): 1190-6.
- Zirath, H, Frenzel, A, Oliynyk, G, Segerstrom, L, Westermark, UK, Larsson, K, Munksgaard Persson, M, Hultenby, K, Lehtio, J, Einvik, C, Pahlman, S, Kogner, P, Jakobsson, PJ and Henriksson, MA (2013). "MYC inhibition induces metabolic changes leading to accumulation of lipid droplets in tumor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(25): 10258-63.
- Zoula, S, Rijken, PF, Peters, JP, Farion, R, Van der Sanden, BP, Van der Kogel, AJ, Decrops, M and Remy, C (2003). "Pimonidazole binding in C6 rat brain glioma: relation with lipid droplet detection." *Br J Cancer* **88**(9): 1439-44.

Table 1. Tumors where altered lipid droplet or expression of lipid-droplet associated proteins is observed

Tissue	Tumor Type	PAT Expression ^a	Lipid Droplets	References
Brain	Human brain tumor	ND	+	Opstad et al. (2008)
Breast/mammary gland	Apocrine carcinoma	Low TIP47	ND	Straub et al. (2010)
		High ADRP	+	Moritani et al. (2011)
	Carcinoma of the breast	High ADRP	ND	(2011)
	Invasive ductal carcinoma	ND	+	Piris et al. (2014)
	Invasive lobular carcinoma	Low ADRP TIP47 ^b	-	Guan et al. (2011) Straub et al. (2010)
Cervix	Invasive lobular carcinoma	Low ADRP	-	Mellick et al. (2012)
	Tubular carcinoma	Low ADRP	-	Straub et al. (2010)
	Cervical dysplasia	High TIP47	-	Szigeti et al. (2009)
Colon	Invasive carcinoma	High TIP47	-	Than et al. (2003) Szigeti et al. (2009)
	Adenocarcinoma	High ADRP, TIP47	+	Than et al. (2003) Straub et al. (2010)
	Tubular Adenoma	High ADRP, TIP47	-	Accioly et al. (2008) Straub et al. (2010)
Esophagus	Esophageal adenocarcinoma	ADRP	ND	Yoshii et al. (2014)
Kidney	Chromophobic renal cell carcinoma	ADRP, PLIN	TIP47, +	Straub et al. (2010)
	Clear cell renal carcinoma	ADRP, PLIN	TIP47, -	Straub et al. (2010) Rae et al. (2000)
	Invasive renal squamous cell carcinoma	High ADRP ^b High ADRP ^b	- +	Yao et al. (2003) Yao et al. (2005)
	Kidney angiomyolipoma	High ADRP ^b	-	Than et al. (2003)
	Papillary renal cell carcinoma	ND	-	Straub et al. (2010)
		ADRP, PLIN	TIP47, +	Straub et al. (2010)
Larynx	Laryngeal squamous cell carcinoma	ADRP, PLIN	TIP47, -	Straub et al. (2010)
Liver	Cholangiocarcinoma	High ADRP, PLIN	low -	Straub et al. (2010)
	Dysplastic nodules	High ADRP, PLIN	low -	Straub et al. (2010)
	Focal nodular hyperplasia	High ADRP, PLIN	low -	Straub et al. (2010)
	Hepatocellular adenoma	High ADRP, PLIN	low -	Straub et al. (2010)
	Hepatocellular carcinoma, all grades	High ADRP, TIP47, PLIN	low +	Straub et al. (2010) Kurokawa et al. (2004)
	Hepatocellular carcinoma grade 1	High ADRP, PLIN	TIP47 -	Straub et al. (2010)
	Hepatocellular carcinoma grade 2	High ADRP ^b	PLIN -	Straub et al. (2010)
	Hepatocellular carcinoma grade 3	High ADRP, PLIN	low -	Straub et al. (2010)
Lung	Large cell lung carcinoma	High ADRP, TIP47	+	Straub et al. (2010)
	Lung adenocarcinoma	High TIP47	+	Straub et al. (2010)
	Lung squamous cell carcinoma	High ADRP	ND	Zhang et al. (2014)
		High ADRP, TIP47	+	Straub et al. (2010)
	Sarcomatoid/pleomorphic	ADRP Low ADRP, high TIP47	ND -	Zhang et al. (2014) Straub et al. (2010)

Lymphoma	lung carcinoma Burkitt lymphoma	ADRP ^b	+	Ambrosio et al. (2012)	
Ovary	Ovarian adenocarcinoma	ND	+	Nieman et al. (2011)	
Pancreas	Pancreas adenocarcinoma	ductal ADRP, PLIN	TIP47, -	Straub et al. (2010)	
Prostate	Prostate adenocarcinoma	gland ADRP, PLIN	TIP47, NC	Straub et al. (2010)	
Salivary Gland	Mammary secretory carcinoma	analogue	ADRP	+	Mariano et al. (2013)
Skin	Actinic keratosis		Low ADRP, TIP47	-	Straub et al. (2010)
	Apocrine-eccrine carcinoma		ADRP, low PLIN	+	Boussahmain et al. (2013)
	Basal cell skin carcinoma		High ADRP, low TIP47	+	Straub et al. (2010)
	Cutaneous apocrine carcinoma		ADRP	-	Ostler et al. (2010)
	Sebaceous adenoma		Low ADRP	ND	Milman et al. (2014)
	Sebaceous carcinoma		High ADRP, PLIN		Piris et al. (2014)
			ADRP	-	Straub et al. (2010)
			High ADRP, TIP47, PLIN	+	Ostler et al. (2010)
			ADRP	+	Straub et al. (2010)
			ADRP, TIP47, PLIN	+	Muthusamy et al. (2006)
Skin carcinoma <i>in situ</i>			ADRP	+	Milman et al. (2014)
			PLIN, ADRP	-	(2014)
			Low ADRP, TIP47	-	Boussahmain et al. (2013)
			Low ADRP, TIP47	+	
			ADRP		Straub et al. (2010)
Stomach			Low ADRP		Straub et al. (2010)
			ADRP		Ostler et al. (2010)
	Gastric adenoma	ADRP	+	Milman et al. (2014)	
	Gastric adenocarcinoma	ADRP	+	Boussahmain et al. (2013)	
Stomach	Stomach adenocarcinoma	ADRP, PLIN	TIP47, -	Straub et al. (2010)	

ADRP adipose-differentiation-related protein, NC Data presented by the author does not allow for a clear conclusion to be drawn, ND not determined, PAT perlipin-ADRP-TIP47, PLIN perlipin, TIP47 tail-interacting protein of 47 kDa

^a Protein detection and/or increased or decreased expression when compared to non-tumoral tissue/samples

^b Alteration of mRNA levels