



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**“Metabolismo lipídico en un modelo experimental de  
cáncer de pulmón: rol de FABP5”**

---

**Tesista: Garcia Karina**

**Director/a: Scaglia Natalia**

**Codirector/a: Córscico Betina**

**Año: 2022**

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es la principal causa de defunciones por cáncer en nuestro país. Desafortunadamente, en la mayoría de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón (LUAD) las terapias dirigidas no fueron exitosas. Por lo tanto, son necesarios nuevos biomarcadores y blancos terapéuticos para este tipo de cáncer. El metabolismo celular ha resurgido como un área prometedora para el tratamiento del cáncer. Las células tumorales presentan una reprogramación del metabolismo que sustenta la incrementada demanda de energía y de sustratos para la síntesis de macromoléculas. Las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) son proteínas citosólicas que unen ácidos grasos (FA) de cadena larga con gran afinidad. Se ha propuesto que las FABPs podrían transportar FA a diferentes compartimentos celulares dirigiéndolos así hacia su oxidación, utilización en síntesis de lípidos complejos y regulación de factores transcripcionales. FABP5, a diferencia de otras isoformas, ha sido asociada positivamente con el desarrollo de ciertos cánceres. Su rol como promotora tumoral está generalmente relacionado con su capacidad de translocar al núcleo y regular la expresión génica mediante la activación de Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPARs). Sin embargo, su contribución en la progresión de LUAD y reprogramación metabólica no ha sido completamente esclarecida.

En este estudio evaluamos la importancia de FABP5 en LUAD y su rol en el metabolismo lipídico de células tumorales. Utilizando herramientas bioinformáticas observamos que los niveles elevados de FABP5 se asocian con un peor pronóstico en pacientes con LUAD. La función de FABP5 en este tipo de cáncer se investigó en modelos con niveles alterados de FABP5 generados por inhibición genética/farmacológica y sobre expresión de la proteína en células A549. Ensayos de marcación con isótopos radioactivos en el *knockdown* o la inhibición de FABP5 mostraron una reducción de la incorporación de FA en lípidos complejos y lo opuesto se observó en el modelo de sobre expresión. Además, demostramos que FABP5 es requerida para la síntesis *de novo* de FA y regula la expresión de enzimas involucradas en la vía (incluyendo FASN y SCD-1). Contrariamente, en ningún modelo se encontró afectada la oxidación de FA. Entonces, FABP5 regula el metabolismo lipídico direccionando FA hacia la síntesis de lípidos complejos, mientras que no altera su catabolismo *in vitro*. Asimismo, un análisis de secuenciación masiva de ARN (RNA Seq) en células A549 tratadas con el inhibidor de

FABP5 mostró profundos cambios en el transcriptoma. Este ensayo respalda los resultados observados en el metabolismo de FA y resalta el valor de FABP5 para el avance en el ciclo celular. En el mismo sentido, se demostró por citometría de flujo y Western Blot que la inhibición de FABP5 genera un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1. Finalmente, en los modelos celulares con niveles alterados de FABP5 observamos que esta proteína es necesaria para la proliferación, adhesión y migración celular; e *in vivo* promueve el desarrollo tumoral en ratones *nude*.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que FABP5 es un punto clave en la regulación del metabolismo de lípidos y la progresión tumoral en LUAD, ubicándose como un probable blanco terapéutico para esta enfermedad.

El presente trabajo de tesis, que lleva el título “Metabolismo lipídico en células tumorales: rol de FABP5.”, se realizó para optar al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (Área Ciencias Biológicas) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

El mismo se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), instituto que pertenece a la UNLP y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ubicado en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

Este trabajo contó con la dirección de la Dra. Natalia Scaglia (Investigadora Adjunta, CONICET; Jefa de Trabajos Prácticos, Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP) y la co-dirección de la Dra. Betina Córscico (Investigadora Principal, CONICET; Prof. Titular, Departamento Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Argentina).

Para su realización se recibió el apoyo financiero la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ANCEFN) mediante la “Beca de Iniciación en la Investigación Científica Carlos y Eduardo Brenner” y del CONICET mediante una “Beca de Finalización del Doctorado”.

El trabajo experimental se llevó a cabo mediante financiación de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2014-0747, PICT-2017-2548, PICT-2017-3082), de la Fundación Florencio Fiorini-Academia Nacional de Medicina (Subsidios para Investigación en Ciencias Biomédicas año 2015) y de la UNLP (Proyecto Acreditado M188).

### **PUBLICACIONES DURANTE EL DESARROLLO DEL PRESENTE DOCTORADO**

Relacionadas con esta tesis:

- *Fatty acid binding protein 5 regulates lipogenesis and tumor growth in lung adenocarcinoma.* Karina Andrea Garcia, María Lucía Costa, Ezequiel Lacunza, María Elizabeth Martinez, Betina Córscico, Natalia Scaglia. *Life Sciences*. 2022, 301 (120621). DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120621.

No presentadas en esta tesis:

- *De novo lipogenesis at the mitotic exit is used for nuclear envelope reassembly/expansion. Implications for combined chemotherapy.* Rodriguez Sawicki L.\* , Garcia K.A.\* , Corsico B., Scaglia N. *Cell Cycle*. 2019, 18(14):1646-1659. DOI: 10.1080/15384101.2019.1629792. \* These authors contributed equally to this work.

## AGRADECIMIENTOS

A Natalia por la dirección de mi tesis y por acompañarme durante el desarrollo de este trabajo con paciencia y dedicación. Por compartir su conocimiento, generar un ambiente de igualdad y compañerismo, de respeto y consideración. Su guía ha sido fundamental para mí y me ha formado profesionalmente pero también personalmente.

A Betina por la co-dirección de este trabajo, por recibirme, darme un lugar en el laboratorio y compartir su experiencia e interés por la ciencia.

A Luciana, Valeria y Jorge que me acompañaron y aconsejaron durante los primeros años en el laboratorio. A Gisela, Natalia Bottasso, Julián y Nahili que fueron grandes compañeros de trabajo, de los que he aprendido y compartimos momentos inolvidables. A Elizabeth quien llevó a cabo los ensayos con células CaLu-6 y realizó su tesina de grado en el laboratorio. A Santiago, José, Lucía y Delfina con quienes compartí mis últimos años de tesis y hoy continúan el trabajo en el laboratorio.

A la gente del INIBIOLP que ha colaborado con este trabajo de diferentes maneras, por su apoyo y ayuda constante.

A los Dres Margarita García de Bravo, Juan Lofeudo y Martín Rabassa quienes colaboraron con su experiencia en los ensayos con ratones.

A los Dres Daniel Minsky y Ezequiel Lacunza por su aporte con los análisis bioinformáticos presentados en el presente trabajo.

A mis papás que son parte de lo que soy, que fueron mis primeros maestros y me permitieron tomar mi camino y mis decisiones. Por alentarme a lograr mis objetivos, por su ayuda constante y por acompañarme siempre. A mi hermana que está a la par para lo que necesite.

A Emanuel y Olivia por su paciencia y compañía, por transitar todo este trabajo conmigo. Por escucharme, esperarme y alentarme siempre. Por todo su amor.

## INDICE

RESUMEN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	5
ABREVIATURAS.....	9
ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO.....	10
Cáncer.....	10
Metabolismo lipídico.....	11
Lípidos   Generalidades.....	11
Captación de FA.....	12
Síntesis endógena de FA.....	13
Síntesis de lípidos complejos.....	14
Metabolismo oxidativo.....	15
Regulación de la expresión por FA.....	16
FABPs.....	18
Proteínas que Unen Ácidos Grasos (FABPs).....	18
Proteína que une Ácidos Grasos 5 (FABP5).....	21
Metabolismo tumoral.....	24
Células tumorales   Generalidades.....	24
Metabolismo tumoral.....	26
Metabolismo lipídico en células tumorales.....	27
FABP5 en cáncer.....	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:.....	31
Hipótesis general del trabajo.....	31
Objetivos específicos:.....	32
1. Generar modelos celulares con niveles alterados de FABP5.....	32
2. Estudiar la función de FABP5 en el destino de los FA en células neoplásicas.	33
3. Analizar el papel de FABP5 en el fenotipo celular neoplásico.....	33

MATERIALES Y MÉTODOS:.....	35
Materiales .....	35
Análisis Bioinformático .....	36
Cultivo celular.....	37
Electroforesis en gel de agarosa .....	38
Obtención de bacterias competentes .....	38
Generación del vector de expresión pcDNA-hFABP5.....	38
Transfección.....	40
Ensayos de inhibición de FABPs.....	41
Bradford .....	42
Electroforesis en gel de Poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS).....	42
Western Blot.....	43
Extracción de lípidos .....	43
Cromatografía en capa fina (TLC).....	44
Saponificación y esterificación de FA .....	44
Cromatografía gas líquida .....	45
Purificación de ácido [1- <sup>14</sup> C] palmítico .....	46
Ensayos de marcación radioactiva .....	46
Incorporación de ácido [1- <sup>14</sup> C] palmítico y [ <sup>14</sup> C] acetato .....	47
Captación de ácido palmítico .....	47
Oxidación de FA .....	47
Secreción de Surfactante.....	48
Secreción de Lactato.....	48
Fraccionamiento celular .....	49
Ensayo reportero de luciferasa.....	49
Proliferación .....	51
Curva de crecimiento.....	51
Citometría de Flujo.....	51

Violeta cristal.....	52
Migración .....	52
Adhesión .....	53
Mantenimiento de Ratones.....	53
Ensayo de desarrollo tumoral.....	53
Análisis transcriptómico.....	54
Estadística .....	56
RESULTADOS .....	57
1. Generación de modelos celulares con niveles alterados de FABP5 .....	60
2. Estudio de la función de FABP5 en el destino de los FA en células neoplásicas. 63	
2 A. Lipogénesis .....	63
2 B. Oxidación de combustibles metabólicos .....	69
El contenido total y el perfil de FA no se ven afectados por los niveles de FABP5 .....	71
2 C. Regulación de la expresión génica.....	74
3. Analizar el papel de FABP5 en el fenotipo celular neoplásico .....	79
FABP5 es necesaria para la proliferación celular.....	79
FABP5 está involucrada en la adhesión y migración celular .....	85
FABP5 favorece el desarrollo tumoral in vivo.....	86
Análisis transcriptómico.....	87
DISCUSIÓN.....	91
CONCLUSIÓN.....	96
REFERENCIAS .....	98
APÉNDICE 1 .....	111



## ABREVIATURAS

ACC: acetil-CoA carboxilasa	NFκβ: factor nuclear κβ
ACLY: ATP-citrato liasa	NR: receptores nucleares
ACS: acil-CoA sintasa	NSCLC: carcinoma pulmonar de células no pequeñas
AMPK: quinasa activada por AMP	PA: ácido fosfatídico
BrdU: 5-bromo-2-deoxyuridina	PARP: poli ADP ribosa polimerasa
BSA: albúmina sérica bovina	PBS: buffer fosfato salino
CCLC: The Cancer Cell Line Encyclopedia	PC: fosfatidilcolina
CE: ésteres de colesterol	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
CPT: carnitina palmitoil transferasa	PE: fosfatidiletanolamina
CRABP: proteína celular de unión ácido retinoico	PEI: polietilenimina
DAG: diacilglicéridos	PET: tomografía de emisión de positrones
DGAT: diacliglicerol aciltransferasa	PGC1α: coactivador de PPARγ 1α
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium	PL: fosfolípidos
DMSO: dimetilsulfóxido	PPAR: receptores activados por proliferadores peroxisomales
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	PPRE: elemento de respuesta a PPARs
ERRα: receptor relacionado a estrógenos α	PS: fosfatidilserina
FA: ácidos grasos	PUFA: ácido graso poliinsaturado de cadena larga
FABP: proteína que une ácidos grasos	PVDF: fluoruro de polivinilideno
FASN: ácido graso sintasa	RA: ácido retinoico
FBS: suero fetal bovino	RAR: receptor de ácido retinoico
FFA: ácidos grasos libres	RXR: receptor X retinoide
HIF1: factor inducible por hipoxia 1	SCD-1: estearoil-CoA desaturasa 1
HNF 4α: factor nuclear hepático 4α	SCLC: carcinoma pulmonar de células pequeñas
HRP: peroxidasa de rábano	siRNA: RNA pequeño de interferencia
ILK: quinasa símil integrina	SREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides
lncRNA: ARN largo no codificante	TCGA: The Cancer Genome Atlas Database
LisoPL: lisofosfolípidos	TG: triacilglicéridos
LUAD: Adenocarcinoma de pulmón	TLC: cromatografía en capa fina
LUSC: Carcinoma de células escamosas	TNFα: factor de necrosis tumoral α
LXR: receptor X hepático	
LXRE: elemento de respuesta a LXR	
ME-1: enzima málica 1	
mRNA: ARN mensajero	

## ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

### Cáncer

El término cáncer se aplica a un grupo de enfermedades relacionadas, cuya característica es el crecimiento celular descontrolado en un tejido, pudiendo invadir zonas adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. Mundialmente, el cáncer es la segunda causa de muerte. En el año 2018 se produjeron 9,6 millones de defunciones por cáncer según las estimaciones de la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC). Considerando su ubicación, los tipos de cáncer con mayor mortalidad son: pulmón, mama, colorrectal, estómago e hígado (<http://www.who.int>) [1]. Al igual que en el mundo, en nuestro país, el cáncer representa la segunda causa de muerte. El 15% del total de las defunciones corresponden a pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón, ubicándolo como la principal causa de defunciones por cáncer [2].

El principal factor de riesgo asociado al cáncer de pulmón es el consumo de tabaco en cigarrillo, pipas o de forma pasiva. Existen otros factores como la susceptibilidad genética, dieta, ingesta de alcohol, inflamación crónica pulmonar por infecciones u otras condiciones médicas, exposición a contaminación ambiental o, en trabajadores de industrias, a carcinógenos (asbestos, sílica, radón y metales pesados), que pueden encontrarse independientemente o combinados con el consumo de tabaco [3]. El cáncer de pulmón puede clasificarse principalmente en dos tipos según las características histológicas: carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC; del inglés *small cell lung cancer*) y carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC; del inglés *non small cell lung cancer*). Adicionalmente, el NSCLC se subdivide en adenocarcinoma pulmonar (LUAD, del inglés *lung adenocarcinoma*), carcinoma de células escamosas (LUSC; del inglés *lung squamous cell carcinoma*) y carcinoma de células grandes. El LUAD es el subtipo más común en muchos países; se origina en células epiteliales de pequeñas vías aéreas con diferenciación glandular que secretan mucus y otras sustancias [4]. La mayoría de los pacientes son fumadores, sin embargo, es el principal subtipo histológico de cáncer de pulmón que se desarrolla en pacientes que nunca fumaron [5].

El diagnóstico de NSCLC se realiza generalmente en un estadio avanzado de la enfermedad. Si bien la cirugía en la etapa inicial sigue siendo el pilar del tratamiento, la

terapia molecular dirigida y la inmunoterapia han mejorado el manejo de la enfermedad en pacientes con cáncer inoperable o enfermedad metastásica. En los últimos años se han diseñado terapias dirigidas para el tratamiento de grupos selectos de pacientes con alteraciones genéticas específicas [6]. Para el LUAD se detectan principalmente mutaciones activadoras o sobre expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutaciones en la proteína G monomérica Ras y re-arreglos cromosómicos que involucran al receptor tirosin-quinasa *Alk (Anaplastic lymphoma kinase)* [7, 8]. Sin embargo, en el 30-40% de los LUAD se desconocen cuáles son las alteraciones que promueven el desarrollo del cáncer. Más aún, aproximadamente el 30% de los pacientes con LUAD presentan mutaciones en Ras, para la cual no existen terapias dirigidas efectivas [9]. Nuevas estrategias están enfocadas en mecanismos inmunomoduladores de las células tumorales necesarios para evadir la respuesta inmune. El tratamiento involucra el bloqueo de los receptores antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), muerte celular programada-1 (PD-1) y su ligando, PDL1, lo cual impulsa al sistema inmune a actuar sobre las células tumorales para frenar o reducir su crecimiento. Sin embargo, la respuesta a la inmunoterapia varía dependiendo de las características del tumor. Los pacientes con NSCLC metastásico generalmente se benefician con la inmunoterapia, no obstante, un número de pacientes no responden y presentan un menor tiempo de vida o eventos adversos asociados al sistema inmune. La identificación de nuevos biomarcadores y blancos terapéuticos que beneficien a un mayor número de pacientes con LUAD es un importante objetivo de investigación.

## Metabolismo lipídico

### Lípidos | Generalidades

Los lípidos constituyen un grupo de compuestos químicamente diverso cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua [10]. Pueden clasificarse según su estructura en ácidos grasos (FA), glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, prenoides, sacarolípidos y policétidos [11].

Los FA son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas que pueden encontrarse completamente saturados, con uno o más dobles enlaces y con o sin ramificaciones. Tienen funciones biológicas importantes como fuente de energía, son componentes

estructurales de lípidos complejos, moléculas de señalización y reguladores de la expresión génica.

Los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides son constituyentes esenciales de las membranas biológicas, son anfipáticos y las interacciones hidrofóbicas entre ellos e hidrofílicas con el agua definen su empaquetamiento formando una bicapa membranosa. Así, determinan los límites externos de las células y regulan el tráfico molecular a través de estos límites. En células eucariotas, dividen el espacio interno en compartimentos discretos que separan procesos y componentes. Las bicapas de lípidos organizan secuencias complejas de reacciones y son de importancia tanto para la conservación de energía biológica como para la comunicación intercelular. Cada reino, cada especie, cada tejido o cada tipo celular, así como los orgánulos dentro de ellos tiene un conjunto característico de lípidos de membrana [12].

Los triacilglicéridos (TG) son una forma eficiente de reserva de energía, los átomos de carbono se encuentran más reducidos que en los glúcidos y, al ser no polares, se almacenan en forma anhidra. Estas características permiten obtener mayor energía por unidad de masa en su oxidación completa. En los vertebrados, los adipocitos son células especializadas en la síntesis y almacenamiento de TG, contienen además lipasas que catalizan su hidrólisis liberando FA que se exportan hacia otros tejidos donde son utilizados como combustibles metabólicos.

Adicionalmente, los lípidos funcionan como moléculas de señalización (hormonas y mensajeros intracelulares), cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos y pigmentos.

### Captación de FA

Las células adquieren los FA de la dieta (exógenos) o de la síntesis *de novo* (endógenos). En individuos bien alimentados, la mayoría de las células utilizan los FA exógenos, y la síntesis endógena se encuentra activa solamente en células sensibles a hormonas o con un elevado metabolismo lipídico, como adipocitos, células hepáticas y células alveolares de tipo II [13, 14]. Los FA exógenos presentes en la circulación difunden a través de la bicapa lipídica [15]; sin embargo, el ingreso a la célula se encuentra acelerado por proteínas integrales o asociadas a la membrana. Existe evidencia de que las proteínas transportadoras de FA (FATP 1-6), la proteína de unión

a FA asociada a membrana plasmática (FABPpm) y una FA translocasa (FAT), también conocida como CD36, están involucradas en el proceso [16]. CD36 es conocida como la principal proteína implicada en el transporte de FA en adipocitos, enterocitos, miocitos cardíacos y esqueléticos [17-19]. Además, participa en la regulación del proceso por diferentes mecanismos: CD36 transloca de forma reversible entre endosomas y la membrana plasmática en respuesta a la contracción muscular o a la presencia de insulina, ocasionando un incremento del transporte de FA en minutos [20-22]. A nivel transcripcional los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs), las proteínas de unión a activadores CCAAT (C/EBP) y el factor inducible por hipoxia 1 (HIF1) modulan la expresión de CD36 como respuesta a diferentes estímulos. Recientemente se han descrito modificaciones post traduccionales de CD36, como palmitoilación, N-glicosilación y ubiquitinación, que afectan su estabilidad y el tráfico intracelular [23].

### Síntesis endógena de FA

La síntesis *de novo* de FA utiliza los esqueletos carbonados provenientes del exceso de glúcidos y aminoácidos dietarios. El principal sustrato es un intermediario metabólico, el acetil-CoA citosólico, generado en la célula a partir de citrato o acetato. La ATP citrato liasa (ACLY) convierte el citrato en acetil-CoA (y oxalacetato), cuya carboxilación irreversible a malonil-CoA es el paso limitante de la vía y es catalizado por la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1). La condensación de 7 moléculas de malonil-CoA (con pérdida de un átomo de carbono por descarboxilación) y una molécula de acetil-CoA da origen al producto inicial, un FA saturado de 16 carbonos, el ácido palmítico. La enzima ácido graso sintasa (FASN) cataliza la reacción, y el poder reductor (NADPH) necesario para la síntesis del ácido palmítico proviene principalmente de la vía de las pentosas fosfato o de la enzima málica. El ácido palmítico, a su vez, es sustrato de elongasas y desaturasas, que modifican el largo de la molécula e introducen insaturaciones respectivamente, dando origen a distintos FA. La estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD-1) genera FA monoinsaturados con un doble enlace en la posición  $\Delta 9$ , mientras que las elongasas como ELOVL6 extienden la cadena formando el FA esteárico.

Esta vía se encuentra ampliamente regulada. La enzima limitante de la vía, ACC1, es inhibida de forma alostérica por FA como el ácido palmítico y activada por citrato y, probablemente, por glutamato [24]. Asimismo, en respuesta a una reducción en los niveles de ATP, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) fosforila e inactiva ACC1

reduciendo la síntesis de FA [25]. La señalización por insulina, en cambio, resulta en la desfosforilación y activación de ACC1 [26]. A largo plazo, la expresión de genes involucrados en la lipogénesis que codifican ACC1 y otras enzimas como FASN y SCD1, es modulada principalmente a través de la inducción de SREBP1c (Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1 c) mediada por PI3K [27] y el receptor X hepático (LXR) [28]. Además, en respuesta a situaciones de bajos niveles energéticos intracelulares, AMPK fosforila directamente a SREBP1c, resultando en la reducción de los niveles del factor de transcripción en el núcleo [29].

### Síntesis de lípidos complejos

Los FA exógenos y endógenos son utilizados para la síntesis de diferentes clases de lípidos complejos. En su forma activada como acil-CoA pueden ser incorporados en lípidos de almacenamiento, componentes estructurales de membranas, o bien en lípidos de señalización. Cuando un organismo posee una cantidad de nutrientes que supera los requerimientos celulares, el exceso generalmente es utilizado para la síntesis de FA que son almacenados como TG. Los TG se sintetizan mediante dos vías: la vía del glicerol fosfato y la del monoacilglicerol. La primera tiene lugar en la mayoría de las células y la segunda se da particularmente en el intestino delgado para producir TG a partir del monoacilglicerol incorporado en la dieta. La síntesis de TG requiere FA activados por la acil-CoA sintetasa, como acil-CoA graso, y glicerol 3-fosfato procedente principalmente de la glucólisis. El primer paso de la vía del glicerol fosfato implica la esterificación de un acil-CoA, por la enzima glicerol 3-fosfato acil transferasa (GPAT), al glicerol 3-fosfato. La adición de un segundo FA genera ácido fosfatídico (PA), el cual es defosforilado para dar diacilglicerol. Finalmente, la conversión de diacilglicerol en TG es catalizada por la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Los TG son sintetizados en el retículo endoplásmico e incorporados en gotas lipídicas, que contienen además otros lípidos neutros y se encuentran cubiertas por una monocapa de fosfolípidos.

La incorporación de FA en fosfolípidos ocurre por deacilación y reacilación de fosfolípidos existentes o mediante la síntesis *de novo* de los mismos. La contribución relativa de cada vía depende del tipo celular y del contexto metabólico. La síntesis de fosfolípidos a partir de PA puede ocurrir por la vía de Kennedy, la cual implica la desfosforilación del PA seguido de la unión de una cabeza polar activada (CDP-colina, CDP-etanolamina), mediante un enlace fosfodiéster, para dar fosfatidilcolina (PC) o fosfatidiletanolamina (PE) [30]. Alternativamente, el PA puede ser convertido en CDP-

diacilglicerol y la unión con glicerol 3-fosfato o inositol da origen a fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol. Mientras que fosfatidilserina (PS) es sintetizada por una reacción de intercambio de la cabeza polar de PE o PC.

Asimismo, en el retículo endoplásmico se producen esfingolípidos a partir de un FA y una serina que, tras una serie de reacciones catalizadas por distintas enzimas, producen ceramida, un lípido señalizador. Modificaciones como fosforilaciones, glucosilaciones o adición de una cabeza polar, colina por ejemplo, sobre la ceramida conducen a la formación de los distintos esfingolípidos. Otros lípidos de señalización, como los eicosanoides, se sintetizan a partir del ácido araquidónico y, por acción de ciclooxigenasas, se obtienen prostaglandinas o, por la leucotrieno sintasa, se generan leucotrienos.

### Metabolismo oxidativo

Según los requerimientos energéticos, los FA *per se* pueden ser oxidados completamente como fuente de energía. La principal vía de degradación de los FA es la  $\beta$ -oxidación que tiene lugar en la mitocondria. Para atravesar la membrana mitocondrial los FA activados deben ser convertidos en ésteres de carnitina, por la acción de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), que se localiza en la membrana externa mitocondrial. Así, cruzan el espacio intermembrana e ingresan a la matriz mitocondrial mediante difusión facilitada por un transportador acil-carnitina/carnitina. Finalmente, se genera acil-CoA en la reacción catalizada por carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2). Este proceso constituye el paso limitante de la oxidación de FA, particularmente la reacción catalizada por CPT1 [31]. Dentro de la mitocondria, la oxidación de FA comprende una serie de reacciones cíclicas que comienza por la dehidrogenación de acil-CoA graso, seguido por hidratación que genera 3-hidroxy acil-CoA. A continuación, una nueva dehidrogenación produce 3-ceto acil-CoA que es clivado por una tiasa produciendo el acortamiento de la cadena del FA y generando acetil-CoA. En cada ciclo se corta el FA en dos carbonos y se genera acetil-CoA y poder reductor,  $FADH_2$  y  $NADH$ . El acetil-CoA obtenido es completamente oxidado en el ciclo de Krebs a  $CO_2$  y el poder reductor generado, produce ATP por fosforilación oxidativa. La oxidación de FA se lleva a cabo mayormente en tejidos con elevada demanda de energía (corazón y músculo esquelético) y en el hígado. El receptor nuclear  $PPAR\alpha$  se expresa principalmente en estos tejidos y controla la expresión de genes que codifican a las proteínas involucradas en la  $\beta$ -oxidación de FA [32]. Asimismo,  $PPAR\beta/\delta$  puede regular la expresión de

enzimas pertenecientes a la vía en músculo [33] y el coactivador de PPAR $\gamma$  1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) controla la oxidación de FA a través del receptor relacionado a estrógenos  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) [34].

Por último, las vías de síntesis y degradación de FA se encuentran coordinadas por los niveles de malonil-CoA [35]. El intermediario de la síntesis *de novo* de FA es inhibidor alostérico de la enzima limitante de la  $\beta$ -oxidación, CPT1, evitando la activación de ambas vías simultáneamente [36].

### Regulación de la expresión por FA

Los FA regulan la expresión de múltiples genes a través de cambios en la actividad o cantidad de al menos cuatro familias de factores de transcripción: PPAR, LXR, HNF 4 $\alpha$  (Factor Nuclear Hepático 4 $\alpha$ ) y SREBP. Excepto SREBP, todos los factores de transcripción corresponden a receptores nucleares (NR). Los NR se unen directamente a un elemento de respuesta en el ADN y regulan la expresión de genes por inducción dependiente de ligando, represión ligando-independiente o transrepresión ligando-dependiente [37].

Los PPARs juegan un rol central en la regulación de la expresión génica mediada por FA, son NR activados por una variedad de ligandos sintéticos y naturales [38]. Existen tres subtipos PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$  que se diferencian en la distribución tisular, función y especificidad por ligandos. PPAR $\alpha$  se expresa principalmente en tejidos oxidativos como adiposo, músculo cardíaco y esquelético e hígado, PPAR $\beta/\delta$  se encuentra en numerosos tipos celulares y PPAR $\gamma$  presenta una elevada expresión en tejido adiposo y macrófagos. Los PPARs forman heterodímeros con el receptor nuclear de retinoides (RXR) y unen FA, en especial los FA poliinsaturados de cadena larga (PUFAs), derivados eicosanoides y otros compuestos lipofílicos. La unión del ligando al receptor promueve la asociación física con el ADN en una secuencia específica denominada elemento de respuesta a PPARs (PPRE), presente en la región reguladora de los genes blanco. Al mismo tiempo, genera un cambio conformacional que promueve la asociación de co-activadores y la pérdida de proteínas co-represoras impulsando la transcripción génica. Dependiendo del tipo, ligando y contexto celular, los PPARs regulan la transcripción de numerosos genes vinculados a metabolismo de lípidos, glúcidos, inflamación, proliferación y diferenciación, entre otras vías [39].



Los receptores X hepáticos forman parte de la familia de NR y activan la transcripción de determinados genes a través de la unión al ligando. Existen dos isoformas, LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ , ambas heterodimerizan con RXR y se unen al elemento de respuesta a LXR (LXRE) que se encuentra en la región regulatoria de los genes blanco. Se ha determinado que los ligandos naturales de los LXR son derivados de colesterol que se producen en la vía de síntesis de colesterol o de hormonas esteroideas [40]. Sin embargo, los FA insaturados suprimen la expresión de SREBP1c a través de la inhibición de LXR [41]. Estos receptores han sido caracterizados como reguladores del metabolismo de lípidos y carbohidratos y, además, funcionan como sensores de esteroides protegiendo a las células de una sobrecarga de colesterol.

HNF4 $\alpha$  es un NR necesario para el desarrollo del hígado e intestino que se expresa también en riñón y en células pancreáticas. Se ha reportado que los FA de cadena larga modulan la actividad transcripcional de HNF4 $\alpha$  por unión de sus derivados tioester acil-CoA [42]. Este receptor es indispensable para la expresión constitutiva de genes clave en el transporte y metabolismo de lípidos [43], y para la regulación del transporte de glucosa y la glucólisis [44].

SREBP constituye una familia de factores de transcripción que regulan la homeostasis lipídica, controlando la expresión de enzimas que participan de la síntesis de FA, colesterol, TG y fosfolípidos. Existen tres isoformas SREBP1a, SREBP1c y SREBP2 que presentan diferentes funciones y son sintetizados como precursores inactivos que permanecen en la membrana del retículo endoplásmico. El proceso de activación de SREBP implica una serie de dos clivajes que liberan el dominio N terminal de la proteína (SREBP maduro), el cual transloca al núcleo y regula la expresión de los genes blanco. Los PUFAs inhiben la expresión de genes hepáticos involucrados en las síntesis de FA. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que los PUFAs reducen los niveles de RNA mensajero de SREBP1c, al menos en parte, mediante la inhibición de LXR, un conocido inductor de la expresión de SREBP1c [41]. Asimismo, los PUFAs alteran el proceso proteolítico requerido para la activación de SREBP manteniéndolo unido a la membrana del retículo endoplásmico y disminuyendo en consecuencia su rol como factor de transcripción en el núcleo. Así, reducen la expresión de los genes blanco de SREBP1c que incluyen ACC, FASN regulando la síntesis *de novo* de FA. La maduración de SREBP1 también está modulada por los niveles de PC [45], resaltando su regulación coordinada por múltiples productos.

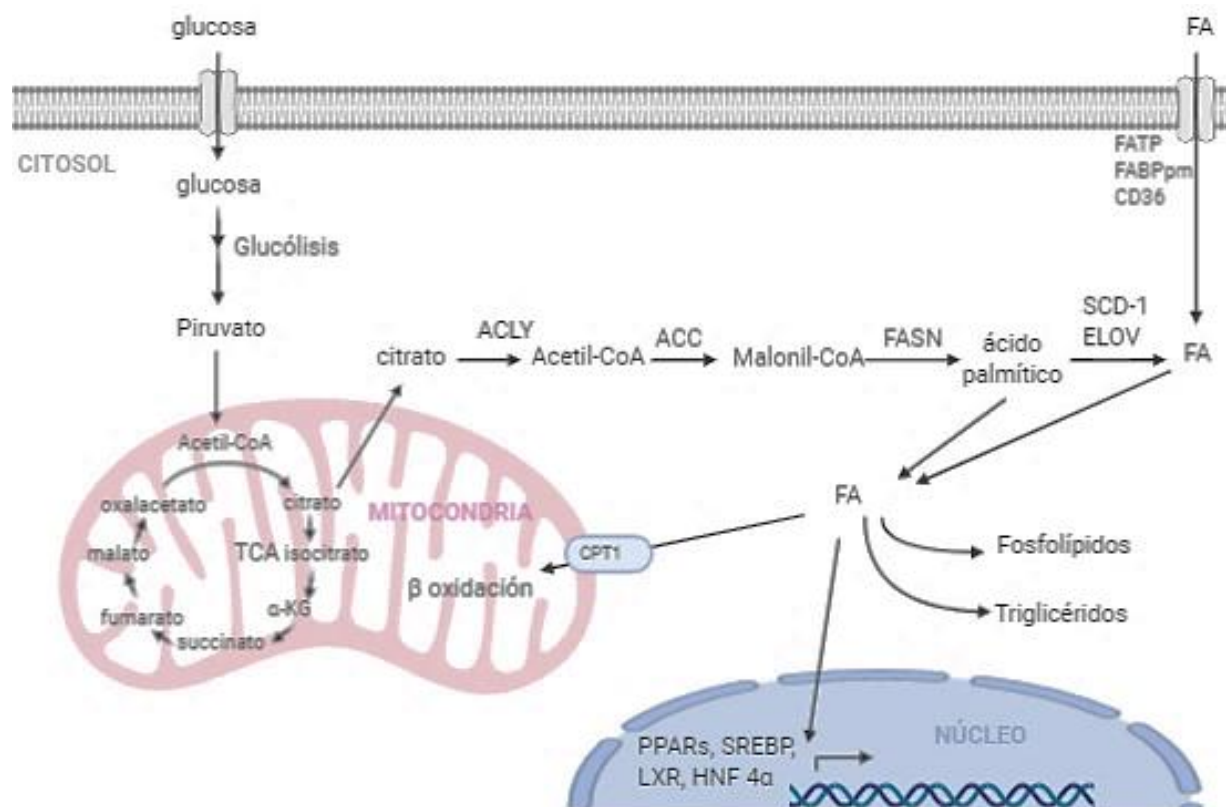


Figura 1: Esquema del metabolismo de FA.

## FABPs

### Proteínas que Unen Ácidos Grasos (FABPs)

Las FABPs (del inglés *Fatty Acid Binding Proteins*) son una familia de pequeñas proteínas intracelulares citoplasmáticas de 14-15 kDa que unen de forma reversible ligandos hidrofóbicos, entre los que se encuentran los FA de cadena larga saturados e insaturados y otros ligandos como eicosanoides, grupo hemo y fosfolípidos [46, 47]. Existen al menos diez isoformas en humanos codificadas por genes cuya estructura está constituida de 4 exones y tres intrones. Las FABPs presentan una moderada homología de secuencia que varía entre un 20 y un 70% lo cual permite dividirlos en tres grupos 1) FABP1 y FABP6, 2) FABP3, FABP4, FABP5, FABP7, FABP8 y FABP9, 3) FABP2. Estos grupos se determinan por las diferencias en la afinidad y especificidad de ligandos [48, 49]. Sin embargo, análisis extensos han demostrado que las distintas isoformas poseen una estructura terciaria conservada. Dicha estructura se compone de un barril beta constituido por 10 cadenas β antiparalelas que se organizan en dos hojas β perpendiculares, con 5 cadenas cada una, y definen la cavidad de unión a ligando. Entre

la primera y la segunda cadena  $\beta$  se encuentran dos  $\alpha$  hélices formando un portal (Figura 2) [49, 50].

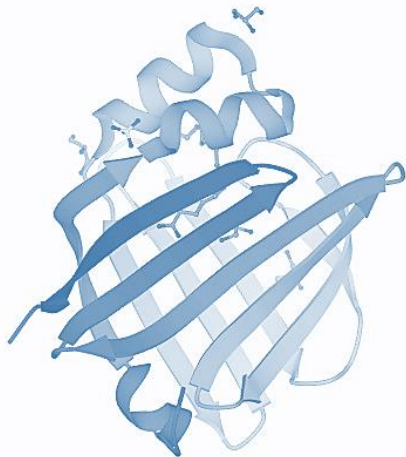


Figura 2: Estructura de la proteína de unión a ácidos grasos epidermal (FABP5) con ácido linoleico como ligando. PDB 4LKT.

Las FABPs han sido nombradas según el órgano donde se identificaron o en el que se expresan en forma predominante, pero sus perfiles de expresión no son exclusivos de un órgano específico. Por este motivo se designaron números para referir a cada isoforma (Tabla 1) [51]. Trabajos previos de nuestro laboratorio han contribuido en el estudio y caracterización biofísica de las FABPs [52-56]. Sin embargo, sus funciones aún están en discusión [47]. Se ha propuesto que podrían unir FA y facilitar el transporte a diferentes compartimentos celulares específicos dirigiéndolos así hacia su oxidación, utilización en síntesis de lípidos complejos o regulación de factores transcripcionales [46]. La existencia de diez FABPs y la presencia simultánea de más de una isoforma en un tejido sugiere que las mismas podrían tener funciones no redundantes. Más específicamente, los posibles roles de las FABPs asociados al metabolismo de los FA varían entre isoformas. En enterocitos, por ejemplo, un trabajo de nuestro laboratorio muestra que el *knockdown* de FABP1 produce una reducción de la captación de FA exógenos y de la secreción de lípidos al medio. Además, se observó una disminución de la incorporación de FA en fosfolípidos y de la proliferación celular [57]. En el mismo sentido, se ha observado en fibroblastos que el aumento de FABP1 favorece la internalización de FA y su incorporación en fosfolípidos [58]. En cambio, la sobre expresión de FABP2 en células del epitelio intestinal favorece la oxidación de FA

mediante la modificación de la expresión y la actividad de las enzimas que participan de la vía, al mismo tiempo que reduce los niveles de enzimas que participan de la síntesis de FA [59]. Estudios en ratones *knockout* para FABP3 muestran una reducción de la captación de FA de cadena larga en cardiomiocitos y musculo esquelético, con un incremento del consumo de glucosa. Sugiriendo que la ausencia de FABP3 resulta en un cambio del sustrato utilizado para la obtención de energía [60].

Distintas isoformas de FABPs afectan el metabolismo celular mediante la regulación de la expresión génica de proteínas clave. Se ha descrito la interacción física de algunas FABPs con NR. Estos receptores se ubican generalmente en el núcleo, por lo que los ligandos deben ser transportados hacia ellos. Entre los ligandos de los NR se encuentran los FA de cadena larga y el ácido retinoico, lípidos que son unidos por FABPs. FABP1 activa su propia expresión y la de otros genes, mediante la interacción con HNF4 $\alpha$  en hígado [61]. En hepatocitos también se estableció la interacción directa entre FABP1 y PPAR $\alpha$  favoreciendo la transcripción de genes involucrados en la oxidación de FA de cadena larga y en la gluconeogénesis, como así también, la transcripción del gen que codifica para FABP1 [62]. FABP4 y FABP5 translocan al núcleo en respuesta a la unión de determinados ligandos e interaccionan específicamente con PPAR $\gamma$  y PPAR $\beta/\delta$  respectivamente. Así, ceden el ligando a los receptores y regulan la expresión de numerosos genes [63]. Recientemente, un estudio reveló la interacción directa entre FABP5 y PPAR $\gamma$  por co-inmunoprecipitación en la línea celular PC3 proveniente de la metástasis de un adenocarcinoma prostático [64]. Por lo tanto, la relación entre FABPs y NR es compleja y podría depender en gran medida del contexto celular/ambiental.

GEN	LOCALIZACIÓN CROMOSOMAL	NOMBRE	NOMBRES ALTERNATIVOS	EXPRESIÓN	NÚMERO DE AMINOÁCIDOS
FABP1	2p11	FABP1	L-FABP, FABP hepática,, proteína de unión a hemo	Hígado, intestino, páncreas, riñón, pulmón, estómago	127
FABP2	4q28-q31	FABP2	I-FABP, FABP intestinal	Intestino, hígado	132
FABP3	1p33-p31	FABP3	H-FABP, FABP cardíaca, O-FABP, inhibidor de crecimiento derivado de mama (MDGI)	Músculo cardíaco y esquelético, cerebro, riñón, pulmón, estómago, testículo, glándula adrenal, glándula mamaria, placenta, ovario, tejido adiposo marrón	133
FABP4	8q21	FABP4	A-FABP, FABP de adipocito, aP2	Adipocito, macrófagos, células dendríticas, fibras de músculo esquelético	132
FABP5	8q21.13	FABP5	E-FABP, FABP epidermal, FABP de queratinocito (K-FABP), FABP asociada a psoriasis (PA-FABP)	Piel, lengua, adipocitos, macrófagos, células dendríticas, glándula mamaria, cerebro, estómago, intestino, riñón, hígado, pulmón, corazón, músculo esquelético, testículo, retina, placenta, bazo	135
FABP6	5q23-q35	FABP6	IL-FABP, FABP ileal, proteína que une lípidos ileal (ILLBP), proteína que une ácidos biliares (BABP)	Íleon, ovario, glándula adrenal, estómago	128
FABP7	6q22-q23	FABP7	B-FABP, proteína que une lípidos de cerebro ( BLBP), MRG	Cerebro, sistema nervioso central, células de la glía, retina, glándula mamaria	132
FABP8	8q21.3-q22.1	FABP8	M-FABP, proteína 2 de mielina periférica (PMP2)	Sistema nervioso periférico, células de Shwann	132
FABP9	8q21.13	FABP9	T-FABP, proteína que une lípidos de testículo (TLBP),	Testículos, glándulas salivales, glándula mamaria	132
FABP12	8q21.13	FABP12	-----	Células de retinoblastoma, retina, células germinales de testículo, corteza cerebral	140

Tabla 1: Denominación y localización de FABPs en mamíferos [47, 65].

### Proteína que une Ácidos Grasos 5 (FABP5)

FABP5, también denominada FABP de queratinocitos, cutánea o epidermal, se describió por primera vez en queratinocitos de pacientes con psoriasis y se expresa en una variedad de tejidos/tipos celulares como macrófagos, adipocitos, células dendríticas, glándula mamaria, células epidérmicas, cerebro, riñón, hígado, pulmón y testículos [66, 67]. El gen que codifica para FABP5 murina mantiene la estructura canónica de la familia de las FABPs y posee 560 sitios de unión en la región “*río arriba*” del promotor, con un 80% de identidad para 40 factores de transcripción. Aquellos factores de transcripción que están bien caracterizados como MyoD, C/EBP, HNF1, AP1 explicarían el amplio perfil de expresión de FABP5 [68]. La estructura terciaria de esta FABP es análoga a la del resto de los miembros de la familia y es capaz de unir FA de cadena larga, retinoides, endocannabinoides y proliferadores peroxisomales [69, 70]. En humanos, FABP5 existe en forma predominante como un equilibrio dinámico entre monómero y dímero, con una pequeña cantidad formando oligómeros, posiblemente tetrámeros [70]. Además, se ha descrito que la unión de FABP5 con FA activadores (principalmente FA insaturados) produce un cambio conformacional que deriva en la generación de una señal de localización nuclear, donde estimula la activación de NR [71].

Debido a su afinidad por diferentes ligandos y su expresión ubicua, es complejo definir una función específica en el metabolismo lipídico para FABP5. Ratones *knockout* fueron generados con el objetivo de examinar el fenotipo metabólico asociado al rol biológico de la proteína. Estos ratones fueron viables y no revelaron alteraciones macroscópicas, sin embargo, se observó un incremento de los niveles de la isoforma 3 de las FABPs en hígado que podría enmascarar el efecto de la ausencia de FABP5 [72, 73]. Otro estudio, en el que no hubo compensación tras la eliminación de FABP5, reveló alteraciones en los TG y colesterol plasmático. Además, tras ser expuestos a una dieta alta en grasas, el peso corporal se redujo y hubo un aumento de la sensibilidad a la insulina respecto de los ratones control. Los resultados sugieren un rol de FABP5 en el metabolismo de la glucosa [74]. Inesperadamente, ratones que sobre expresan FABP5 en adipocitos presentaron una disminución de los niveles de FABP4 acompañado de un incremento en la lipólisis [75]. Sin embargo, los resultados fueron relacionados directamente con el contenido total de FABPs en adipocitos y no con la función específica de una isoforma, considerando que los ratones *knockout* para FABP4 presentan un incremento de los niveles FABP5 y una reducción de la lipólisis [76].

La compensación con otras isoformas en estos modelos incentivó la generación de ratones doble *knockout* para obtener información sobre el rol fisiológico de las FABPs. El estudio de ratones FABP5<sup>-/-</sup>/FABP3<sup>-/-</sup> muestra, en células alveolares, una reducción

de la captación e incorporación de ácido palmítico en lípidos complejos y en la oxidación del FA, que puede revertirse con el agregado de un agonista de PPAR $\gamma$ . Los autores del trabajo proponen que FABP5 sería importante para la incorporación de FA en lípidos complejos y FABP3 en la  $\beta$ -oxidación [77]. En el caso de los ratones FABP4<sup>-/-</sup>/FABP5<sup>-/-</sup>, no se evidenciaron alteraciones importantes en el crecimiento o la fertilidad, pero al someterlos a una dieta alta en grasas, se observa una reducción en la ganancia de peso y en la adiposidad respecto de los ratones control como consecuencia de un incremento del gasto energético. En el músculo de estos ratones *knockout* la deficiencia de FABPs favorece la oxidación de FA, reduce el contenido de TG y aumenta la sensibilidad a la insulina. En el hígado, se observa una reducción de SREBP1c que produce la disminución de las enzimas que participan de la síntesis *de novo* de FA y la acumulación de los mismos. La distribución, el metabolismo de FA y los niveles de citoquinas derivadas del tejido adiposo se encuentran alterados en este modelo. En consecuencia, la ausencia de FABP4 y FABP5 simultáneamente protege de obesidad producida por la dieta, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y de enfermedad por hígado graso [78]. Ambas isoformas de FABP también se expresan en células endoteliales de capilares y su eliminación reduce el transporte trans endotelial de FA y la captación de los mismos por el corazón y el músculo esquelético durante el ayuno. Así, en ratones FABP4<sup>-/-</sup>/FABP5<sup>-/-</sup> se observa un incremento de FA no esterificados y una reducción de los niveles de glucosa en suero [79].

Trabajos realizados en líneas celulares revelan la importancia de FABP5 en numerosos y variados procesos biológicos. En queratinocitos se ha reportado que FABP5 es necesaria para la diferenciación celular. La ausencia de la proteína disminuye la captación de ácido linoleico y en consecuencia el contenido intracelular de sus derivados que son necesarios para la activación del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF $\kappa\beta$ ) [80]. Además, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) induce diferenciación de queratinocitos mediante la activación de PPAR $\beta/\delta$  por FABP5 [63]. En el mismo sentido, se demostró que FABP5 está regulada por el factor de crecimiento neuronal y su capacidad de transportar FA poliinsaturados de cadena larga es necesaria para el crecimiento correcto de neuritas durante la diferenciación de células neuronales [81, 82]. Dependiendo de la localización tisular, FABP5 se ha asociado con diversos procesos incluyendo angiogénesis [83], analgesia [84], cognición [85] y respuesta inmune [86].

## Metabolismo tumoral

### Células tumorales | Generalidades

El desarrollo tumoral se ha explicado como un proceso de múltiples pasos sucesivos de mutación y selección clonal, originado en células normales [87]. Las modificaciones genéticas y epigenéticas hereditarias dan lugar a la generación de nuevos clones celulares y a la heterogeneidad intratumoral. Así, las células adquieren progresivamente ventajas adaptativas para la supervivencia y crecimiento. En el 2000, Douglas Hanahan y Robert Weinberg resumieron los cambios bioquímicos, moleculares y celulares necesarios para el desarrollo tumoral. Así, describieron seis capacidades adquiridas que comparten prácticamente todas las células transformadas: Autonomía en señales de crecimiento, Insensibilidad a las señales anti proliferativas, Resistencia a la muerte celular, Potencial replicativo ilimitado, Angiogénesis sostenida e Invasión de tejidos y metástasis [88]. Una década después los mismos autores, publicaron una actualización de los “sellos del cáncer” añadiendo a las mencionadas la Reprogramación del metabolismo energético y la Evasión del sistema inmune [89].

- Autonomía en señales de crecimiento: Las células normales requieren señales de crecimiento como factores solubles, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión/interacción célula-célula para proliferar. Las células tumorales, en cambio, son capaces de reducir la dependencia a estas señales proliferativas mediante tres mecanismos: sintetizar los factores de crecimiento, aumentar o modificar la expresión de los receptores que unen dichos factores y alterar las vías de señalización que reciben y transducen esas señales desencadenando una respuesta.
- Insensibilidad a las señales anti proliferativas: Múltiples señales anti proliferativas operan para mantener las células normales en un estado quiescente. Estas señales incluyen inhibidores del crecimiento solubles e inhibidores inmovilizados en la matriz extracelular o en células cercanas. Las células tumorales deben evadir esas señales para multiplicarse. En este sentido, la inactivación de numerosos genes supresores de tumores que actúan para inhibir el crecimiento y la proliferación, ha sido descrita en numerosos cánceres.
- Resistencia a la muerte celular: La muerte celular programada es una barrera natural que evita el desarrollo del cáncer. En las células tumorales los estímulos que la inducen están asociados con los niveles elevados de señalización por oncogenes y por el daño en el ADN debido a la hiperproliferación. Los tumores que progresan a



un mayor grado de malignidad son aquellos que poseen niveles atenuados de muerte celular programada por apoptosis.

- Potencial replicativo ilimitado: las células normales presentan un potencial replicativo finito, determinado por el acortamiento del segmento terminal de los cromosomas, telómeros, que se produce en cada duplicación celular. En cambio, las células tumorales adquieren un potencial replicativo ilimitado formando tumores macroscópicos. El mecanismo subyacente es la inducción de la enzima telomerasa que incorpora nucleótidos en los telómeros. Menos frecuentemente, algunas células tumorales utilizan un mecanismo de mantenimiento de telómeros basado en la recombinación.
- Angiogénesis sostenida: Las células requieren una vía de acceso a nutrientes y oxígeno, y de eliminación de desechos y dióxido de carbono. Las neoplasias incipientes deben activar la expansión de nuevos vasos sanguíneos para progresar a tumores de mayor tamaño. La activación de la angiogénesis se debe a un desbalance en las señales pro y anti angiogénicas.
- Invasión de tejidos y metástasis: Durante el desarrollo tumoral a estadíos avanzados de la enfermedad, se observa invasión local y metástasis distal que es la principal causa de muerte por cáncer. El mecanismo bioquímico implica la modificación de proteínas de adhesión a células cercanas, a la matriz extracelular y la activación de proteasas extracelulares. Este proceso comprende una serie de pasos iniciando con la invasión local, intravasación de células tumorales en los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, tránsito a través de sistema linfático y sanguíneo, extravasación de las células tumorales en zonas distantes, formación de pequeñas colonias y finalmente el crecimiento de tumores macroscópicos.
- Reprogramación del metabolismo energético: La proliferación descontrolada de células tumorales conlleva alteraciones en el metabolismo energético, necesarias para mantener el crecimiento y la división celular. Estas modificaciones (descriptas debajo) se han observado por décadas en diferentes tipos de cáncer, y se encuentran asociadas a la activación de oncogenes y a mutaciones de genes supresores de tumores.
- Evasión del sistema inmune: El sistema inmune está involucrado en la eliminación de tumores incipientes, micro metástasis y tumores de crecimiento lento. Estudios en humanos y modelos animales han demostrado que aquellos tumores que presentan infiltrados inmunes tienen un mejor pronóstico y que individuos inmunocomprometidos son más susceptibles al desarrollo del cáncer. Sin embargo, las células cancerosas evaden al sistema inmune por medio de la liberación de

factores inmunosupresores, o del reclutamiento de células inflamatorias altamente supresoras de la respuesta inmune.

Asimismo, la inestabilidad y variabilidad genética, causadas en gran parte por defectos en los mecanismos de reparación y mantenimiento de ADN, son propiedades que impulsan la acumulación de modificaciones en el genoma de las células tumorales. La generación de nuevos clones con diferentes genotipos provee ventajas selectivas para las células transformadas [90].

Por último, durante el desarrollo tumoral emerge un entorno dado por las interacciones con el microambiente, compuesto por células inflamatorias, matriz extracelular, vasos sanguíneos y diferentes tipos celulares asociados. Prácticamente todas las lesiones neoplásicas presentan infiltrados de células inmunes de distintos tamaños y composición que se consideran una propiedad promotora de la supervivencia y progresión del cáncer. El sistema inmune presenta un rol central en la eliminación de células transformadas, sin embargo, el tumor no solo lo evade, sino que se beneficia del mismo modificando sus funciones y creando un ambiente favorable para el desarrollo neoplásico [91]. Otras células presentes en el microambiente tumoral, como los fibroblastos asociados al tumor y los adipocitos peritumorales, favorecen el desarrollo y progresión del cáncer mediante diversos mecanismos, incluyendo la regulación del metabolismo (ver debajo).

### *Metabolismo tumoral*

Como se mencionó previamente, las células tumorales presentan una reprogramación metabólica direccionada hacia la biosíntesis de macromoléculas necesarias para mantener la exacerbada proliferación celular. En las últimas décadas se ha demostrado que oncogenes y genes supresores de tumores modifican el metabolismo celular [92-95]. Más aún, distintos intermediarios metabólicos regulan la expresión génica [96-99] y modulan la actividad de proteínas que promueven la proliferación celular y la supervivencia [100-103], resaltando la importancia del metabolismo como un partícipe necesario del desarrollo tumoral. El primer fenotipo metabólico descrito en células tumorales data de los años 20, cuando Otto Warburg observó un mayor consumo de glucosa y producción de ácido láctico en tumores, aún en presencia de oxígeno, que en las células normales [104]. Este descubrimiento, denominado “Efecto Warburg”, ha sido documentado en muchos tipos de tumores y es utilizado para la detección de la enfermedad mediante la visualización no invasiva de la captación de glucosa por

tomografía de emisión de positrones (PET), con un análogo de glucosa marcado como reportero [105]. La glucólisis aeróbica descrita por Warburg es ineficiente en términos de producción de ATP en comparación con el direccionamiento del piruvato al ciclo de Krebs acoplado a fosforilación oxidativa. La hipótesis más aceptada sobre la activación de la glucólisis aeróbica en células neoplásicas indica que el aumento del flujo glucolítico provee precursores para las vías biosintéticas que satisfacen las demandas anabólicas de las células proliferativas [106]. Entre las vías derivadas de la glucólisis se encuentran: la ruta de las pentosas fosfato, la biosíntesis de hexosaminas, la generación de glicerol 3-fosfato para la biosíntesis de lípidos y de precursores para la biosíntesis de aminoácidos no esenciales. Además, la conversión de piruvato en lactato regenera el NAD<sup>+</sup>, manteniendo el balance NAD<sup>+</sup>/NADH necesario para sostener el flujo a través de la glucólisis [106] y la acidificación del medio extracelular, que favorece el desarrollo tumoral [107]. Otra alteración metabólica observada en cáncer es el incremento del metabolismo de la glutamina, la cual es convertida en glutamato y posteriormente  $\alpha$ -cetoglutarato manteniendo el ciclo de Krebs por anaplerosis. Esta flexibilidad metabólica beneficia a las células neoplásicas frente a alteraciones en la disponibilidad de nutrientes en un ambiente cambiante durante la evolución del tumor [108]. Además, al igual que en la glucólisis, los intermediarios del ciclo de Krebs son precursores para la síntesis de macromoléculas [109]. Así, la glutamina satisface el requerimiento de esqueletos carbonados, además del nitrógeno reducido para la biosíntesis de macromoléculas como nucleótidos, aminoácidos no esenciales y hexosaminas [110]. La mayor parte de la glutamina es metabolizada a malato, el cual se convierte en piruvato en una reacción que genera NADPH y es catalizada por la enzima málica. El piruvato puede reingresar al ciclo de Krebs o ser excretado como lactato. Esta vía constituye una de los principales mecanismos de producción de NADPH, junto con la ruta de las pentosas fosfato, que brinda el poder reductor para mantener la síntesis de biomoléculas [111]. Asimismo, NADPH es requerido para mantener múltiples sistemas antioxidantes. La incrementada actividad metabólica, la señalización celular y la actividad oncogénica son algunas de las causas de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células tumorales. El exceso de ROS puede generar daño en componentes celulares como ADN, lípidos y proteínas.

### *Metabolismo lipídico en células tumorales*

El metabolismo lipídico es parte de la reprogramación metabólica de células tumorales y se encuentra ampliamente alterado río abajo de señales oncogénicas incluyendo receptores tirosina quinasas, PI3K-Akt y Myc entre otras [112, 113]. La regulación de la síntesis, incorporación, modificación y degradación de lípidos es esencial para el mantenimiento de homeostasis celular y modificaciones en estos procesos pueden afectar la supervivencia. Las alteraciones en el metabolismo lipídico de células tumorales se relacionan con numerosos procesos más allá del crecimiento y la supervivencia celular incluyendo migración, angiogénesis e inmunosupresión [114]. Adultos bien nutridos utilizan los FA dietarios para la síntesis de lípidos complejos, obtención de energía y regulación de la expresión génica. Las células tumorales, en cambio, presentan una activa síntesis endógena de FA para la producción de fosfolípidos de membrana necesarios para la duplicación celular. Si bien la contribución relativa de la síntesis *de novo* ha sido recientemente cuestionada [115], la síntesis exacerbada de FA se ha considerado una característica prácticamente universal de células tumorales y responde a diferentes mecanismos incluyendo la expresión incrementada de las enzimas que participan de la vía [113]. Un aumento en la expresión de FASN se ha observado en una amplia variedad de tumores y sus niveles de expresión correlacionan con la iniciación y la progresión de la enfermedad [116-120]. Trabajos previos de nuestro y otros laboratorios indican que la actividad y la expresión de otras enzimas como ACLY, ACC y SCD-1 son necesarias para el desarrollo del cáncer, incluyendo LUAD [121-127]. Más aún, se han observado elevados niveles de expresión del principal factor de transcripción que regula la síntesis de FA, SREBP1, en cáncer y han sido asociados con metástasis y con un mal pronóstico [128-130]. Señales oncogénicas como PI3K y KRAS pueden activar SREBP1 promoviendo la lipogénesis y el crecimiento de células neoplásicas [131-133]. La síntesis endógena de FA se encuentra activa en condiciones de hipoxia y deficiencia de nutrientes utilizando precursores alternativos a la glucosa, como son la glutamina y el acetato [134, 135]. La importancia de esta vía en la proliferación y su posible uso como blanco terapéutico en enfermedades neoplásicas ha sido ampliamente estudiada [112, 136, 137] y se evidencia con el avance de distintos ensayos clínicos en tumores sólidos (<https://clinicaltrials.gov/> NCT03032484, NCT03179904 y NCT03808558, este último en pacientes con NSCLC). La activación de esta ruta metabólica es necesaria para la duplicación de células normales de mamíferos [138, 139] y levaduras [140, 141], lo que sugiere que es un requerimiento general para la proliferación. Más aún, el efecto de su inhibición no puede ser revertido por la incorporación de FA exógenos [137]. Sin embargo, las células tumorales también utilizan FA exógenos, cuyo “*uptake*” es inducido por mutaciones genéticas y por interacción con el microambiente. En condiciones de

hipoxia o reducida disponibilidad de nutrientes, las células incrementan la captación de lípidos y FA del espacio extracelular, principalmente insaturados, para mantener la proliferación y la supervivencia [142]. Se ha descrito que el transportador de FA, CD36, se expresa en células tumorales con niveles variables dependiendo del tipo celular y el estado del tumor y participa de la homeostasis lipídica, angiogénesis, respuesta inmune, adhesión y metástasis [143].

En cuanto al destino de los FA endógenos y exógenos, algunos trabajos han reportado un aumento en la concentración de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina durante la progresión tumoral, sugiriendo que la síntesis de fosfolípidos se incrementa en comparación con tejido normal [144-146]. Asimismo, distintas enzimas involucradas en la síntesis y remodelado de fosfolípidos se encuentran aumentadas en cáncer. El exceso de FA sintetizados o incorporados del exterior puede ser convertido en TG y almacenado en gotas lipídicas. La acumulación de lípidos provee energía y componentes lipídicos para resistir condiciones de estrés y evita la lipotoxicidad por acumulación de FA en el citosol de las células tumorales [147]. Sin embargo, se ha reportado que un incremento de la síntesis de TG, reduce los niveles de fosfolípidos e inhibe la proliferación e invasión celular [148]. Otro destino de los FA en las células es su degradación para la obtención de energía principalmente en condiciones de estrés metabólico. Algunos tumores podrían beneficiarse más de la activación de la oxidación de FA que de la glucólisis [149], constituyendo un mecanismo de adaptación del metabolismo para sostener la proliferación, supervivencia, resistencia a drogas y metástasis [150, 151].

Así, el metabolismo lipídico es un área de activa investigación en oncología, con un creciente interés en el desarrollo de pequeñas moléculas para inhibir enzimas y transportadores lipídicos.

### FABP5 en cáncer

Los niveles de FABP5 se han encontrado aumentados en múltiples tumores humanos incluyendo carcinoma hepatocelular [152], carcinoma renal de células claras [153], cáncer de cuello de útero [154], próstata [155] y mama [156]. Notablemente, FABP5 correlaciona positivamente con el grado del tumor y con un peor pronóstico de la enfermedad [153, 156-159]. Se ha descrito que oncogenes como c-Myc [160] y Her2neu [161] regulan transcripcionalmente la expresión de FABP5. Recientemente se demostró que el gen que codifica para FABP5 posee una isla CpG en la región

promotora, donde se detectó una hipo metilación durante la carcinogénesis que favorece la expresión de FABP5 mediada por los factores de transcripción Sp1 y c-Myc [162].

FABP5 ha sido identificada como uno de los principales genes cuya expresión cambia sustancialmente en líneas celulares benignas y malignas provenientes de cáncer de próstata y mama [163]. Es esencial para la proliferación, invasión y migración tanto *in vivo* como *in vitro* de líneas celulares tumorales [152, 154, 159, 164, 165]. Su efecto promotor tumoral se asoció a su capacidad de translocar al núcleo e inducir la expresión de VEGF mediante la activación de PPARs en cáncer de próstata [155, 166, 167]. Trabajos realizados en cáncer de mama indican que FABP5 promueve la proliferación y el desarrollo tumoral a través de la activación de PPAR $\beta/\delta$  mediada por ácido retinoico (RA). En estos modelos FABP5 compite con CRABP2 (proteína celular de unión ácido retinoico) por RA, reduce su unión a CRABP2 y la consecuente activación de RAR que regula la expresión de genes promotores del arresto celular y la apoptosis. La unión de FABP5 y RA provoca su traslocación a núcleo y activación de PPAR $\beta/\delta$  favoreciendo la proliferación celular [168, 169]. Además, FABP5 media la señalización por EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) induciendo la expresión de genes target de PPAR $\beta/\delta$  [161, 170] y evita la degradación proteosomal del receptor, favoreciendo así la capacidad metastásica de células neoplásicas [157]. Otros reportes indican que FABP5 interactúa con PPAR $\gamma$  transportando FA al núcleo para su activación y la expresión de genes blanco que favorecen la expansión tumoral [171-173]. En cáncer colorectal, FABP5 favorece el crecimiento y el potencial metastásico de células tumorales por un mecanismo independiente de PPAR $\beta/\delta$  [165]. Recientemente, FABP5 ha sido asociada con la regulación de la expresión génica en cáncer mediante diferentes mecanismos. FABP5 es capaz de promover la proliferación de células de hepatocarcinoma celular mediante la activación post-transcripcional de HIF-1 $\alpha$  que regula la expresión de genes impulsando el almacenamiento de FA y reduciendo la  $\beta$ -oxidación [174]. Además, se reportó la interacción de FABP5 con el receptor ERR $\alpha$  y su coactivador PGC-1 $\beta$  en cáncer de próstata, impulsando la expresión de los genes blanco [175].

La función de FABP5 en el desarrollo y progresión del cáncer se encuentra principalmente asociada a la activación de diferentes receptores nucleares y la consecuente regulación de la expresión génica. Sin embargo, la participación de FABP5 en el direccionamiento de FA hacia las distintas vías metabólicas y su importancia en el fenotipo celular neoplásico ha sido poco estudiada. Asimismo, se desconoce la relevancia de esta proteína en LUAD.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

Las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) son pequeñas proteínas intracelulares que se expresan en casi todos los tejidos de mamíferos. Aunque sus estructuras y distribución tisular han sido ampliamente estudiadas, sus funciones aún están en discusión. FABP5, ha sido asociada positivamente con el desarrollo y la progresión de ciertos cánceres, aunque su función en el metabolismo de los mismos es en general desconocida. Dada la importancia de la síntesis de membranas para la proliferación celular y su posible uso como blanco terapéutico en numerosos cánceres, estudiaremos el rol de FABP5 en el metabolismo de FA de células de LUAD. El objetivo final de este trabajo es por tanto contribuir al conocimiento de la regulación e importancia del metabolismo lipídico en cáncer, así como aportar a la elucidación de las funciones de las FABPs.

### Hipótesis general del trabajo

El aumento de FABP5 observado en ciertos cánceres es parte de la reprogramación metabólica de las células tumorales, direccionando los FA sintetizados *de novo* hacia la producción de membranas. Asimismo, estos FA alteran la expresión génica mediante la transactivación de receptores nucleares por FABP5. Ambas funciones de FABP5 contribuyen a mantener el fenotipo celular transformado. (Figura 3).

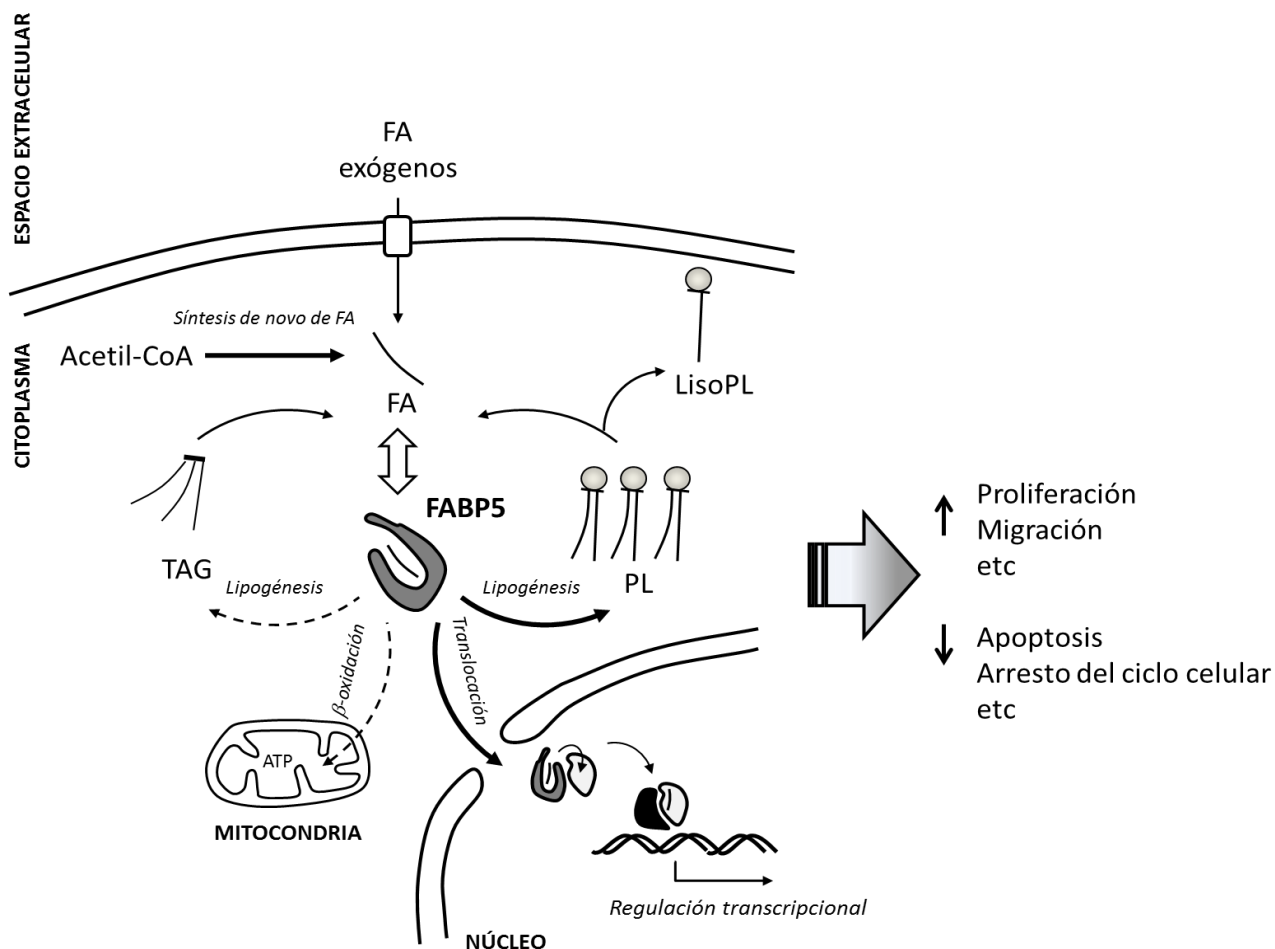


Figura 3: Hipótesis de trabajo.

La hipótesis estadística evaluada en cada ensayo se presenta en la sección Resultados.

### Objetivos específicos:

#### 1. Generar modelos celulares con niveles alterados de FABP5.

Los estudios iniciales se realizarán en células A549, provenientes de un LUAD humano. Se generarán líneas celulares que sobre expresen FABP5 por transfección estable de un plásmido con el cADN de FABP5. Se optimizarán asimismo las condiciones de transfección con siRNAs para generar un modelo de *knockdown* transitorio. Se evaluará la expresión de las otras FABPs en estos modelos y, en caso que hubiese compensación, se realizará un *knockdown* por separado y en conjunto de las distintas isoformas mediante transfección con siRNAs específicos.



## 2. Estudiar la función de FABP5 en el destino de los FA en células neoplásicas.

- A. *Lipogénesis*: En las células tumorales se observa una reprogramación de su metabolismo hacia la síntesis de las macromoléculas (incluyendo fosfolípidos, PL), necesarias para la duplicación celular. Se ha propuesto que las FABPs podrían amortiguar el contenido de FA libres, así como direccionarlos hacia distintas rutas metabólicas. Mediante el empleo de células con niveles alterados de FABP5, se estudiará el rol de esta FABP en la captación y canalización de FA (tanto endógenos como exógenos) hacia la síntesis de distintas clases lipídicas.
- B. *Oxidación de combustibles metabólicos*: Gran parte de la energía (y esqueletos carbonados) necesaria para la síntesis de macromoléculas en las células tumorales proviene de la glucólisis. El aumento en glucólisis, aún en presencia de abundante oxígeno, es común a una gran variedad de cánceres. Evaluaremos si FABP5 está involucrada en la canalización de FA hacia su oxidación y, en tal caso, si tiene un efecto sobre la producción de energía celular a partir de la oxidación incompleta (glucólisis) o completa (hasta CO<sub>2</sub>) de la glucosa, utilizando células que sobre- o sub expresen esta proteína.
- C. *Regulación de la expresión génica*: Además de servir como sustratos para la síntesis de lípidos complejos y como fuente de energía celular, los FA (así como otros compuestos lipofílicos) regulan la transcripción génica mediante su unión y activación de receptores nucleares, como PPARs. Una función bastante más comprobada de las FABPs, es su capacidad para transactivar PPARs. Se ha reportado, por ejemplo, que FABP5 juega un rol esencial en la activación de PPAR $\beta/\delta$  por ácido retinoico en el cáncer de mama. Se desconoce, sin embargo, si los FA producen efectos similares. Así, analizaremos el transcriptoma de células A549 con niveles alterados de FABP5.

## 3. Analizar el papel de FABP5 en el fenotipo celular neoplásico.

Se ha reportado que FABP5 es esencial para el crecimiento y metástasis de distintos cánceres, especialmente cáncer de mama. El efecto promotor tumoral se ha asociado a su capacidad de transactivar PPAR $\beta/\delta$ . Este receptor nuclear regula la transcripción de diversos genes, incluyendo genes supresores tumorales, factores de crecimiento y enzimas del metabolismo lipídico. Se evaluará el impacto de la alteración en los niveles

de FABP5 en el fenotipo celular transformado de líneas derivadas de LUAD. Se determinará la tasa de proliferación celular, progresión del ciclo celular, migración, adhesión *in vitro* y crecimiento tumoral *in vivo*.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

### Materiales

Los reactivos necesarios para el cultivo celular como DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), vitaminas, penicilina/estreptomocina, geneticina y tripsina fueron adquiridos de Gibco, Thermo Fisher Scientific y el suero fetal bovino (FBS) de Natocor. Los elementos plásticos estériles utilizados para cultivo celular se adquirieron en Greiner Bio One (GBO) y los transwells de 0,4  $\mu\text{m}$  de poro de Millipore.

El plásmido de clonado que contiene el cADN de FABP5 humana, pDNR-LIB-hFABP5, se adquirió en Dharmacon. Los primers para el subclonado de la secuencia codificante de FABP5 mediante PCR se sintetizaron en la empresa Eurofins. La purificación de plásmidos se realizó con el kit de miniprep de DSBIO o con el kit PuroPlásmido de Productos BioLógicos (PBL). El estándar utilizado para geles de agarosa fue 1 kb Ladder de DSBIO o High Mass Ladder de Thermo Fisher Scientific. Para extraer ADN directamente de geles de Agarosa se utilizaron columnas de purificación de Merck. Las enzimas de restricción, *EcoRI* y *HindIII*, se compraron en Promega.

De la empresa Thermo Fisher Scientific se adquirieron los siguientes reactivos: Syber Safe, Platinum *Pfx* ADN Polimerasa, el vector pcDNA3.1+, Lipofectamina RNA iMAX, Lipofectamina LTX Reagent Plus, Lipofectamina 2000, T4 ADN Ligasa y Super Signal West Pico.

Las secuencias cortas de RNA de interferencia (siRNA) ONTARGET Plus se adquirieron en Dharmacon. La secuencia 10 (siRNA 10) cuya secuencia blanco es GGAGUUAUUAAGAGAAUG (J-008710-10) está direccionada a la región 3' UTR de la FABP5 humana (2171) y la secuencia 8 (siRNA 8) GUACUCGGAUCAUGAAAA está direccionada al ORF de FABP5 humana (J-008710-08). Como control de transfección se adquirió ON TARGET Plus Non targeting Pool (D-001810-10) compuesto por las secuencias: UGGUUUACAUGUCGACUAA, UGGUUUACAUGUUGUGUGA, UGGUUUACAUGUUUCUGA, UGGUUUACAUGUUUCCUA que no presentan genes blanco en el genoma humano.

Amersham Bioscience proveyó la sal sódica de [ $^{14}\text{C}$ ] acetato 59 mCi/mmol y New England Chemicals, el ácido [ $^{14}\text{C}$ ] palmítico 57 mCi/mmol. Los solventes utilizados (grado HPLC) se obtuvieron de Merck, Carlo Erba o Tedia y las placas prefabricadas para cromatografía en capa fina y la sílica gel se obtuvieron de Merck. Los estándares lipídicos puros fueron 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol y L- $\alpha$ -fosfatidil-colina (de huevo) de

Avanti Polar Lipids; trioleína de Doosan Serdary Research y el estándar para GLC (GLC Reference Standard) se adquirió en Nu-Chek Prep, Inc.

Se adquirió la membrana de PVDF Amersham Hybond P 0,45 en GE Healthcare Life Science y el estándar de peso molecular coloreado Precision Plus Protein Dual Color Standard de BioRad. El anticuerpo para la detección de FABP5, anti-FABP5 y el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra se obtuvieron de R y D Systems. Los anticuerpos anti- $\beta$  Actina, anti-vinculina, como también anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano de Sigma. Los anticuerpos anti-PARP, anti-ciclina D1, anti-ciclina B1, anti-HK1 y anti-ACLY se adquirieron de Cell Signaling Technology. Santa Cruz Biotechnology proporcionó anticuerpos para la detección de FABP1, FABP2, FABP3, FABP7, FASN, SCD-1, LDH e ILK. El anticuerpo anti-FABP4 fue cedido gentilmente por la Dr. Judith Storch (Rutgers University, NJ, USA).

La 5-Bromo-2-deoxyuridina (BrdU) se obtuvo de UpState y el anticuerpo anti-BrdU conjugado con FITC de BD Biosciences. El Ioduro de Propidio y la RNAsa se adquirieron en Sigma, al igual que el C75 y la albúmina sérica bovina (BSA) libre de FA.

El kit para la cuantificación de Lactato corresponde a Wiener Lab y el estándar utilizado, lactato de calcio, fue adquirido en PANREAC Qca SA. El colorante Violeta Cristal fue comprado a Biopack, el inhibidor HTS01037 a Cayman Chemical y el inhibidor SBF126 de Bioreagent.

Los ratones nude se adquirieron en el Bioterio del Centro Atómico de Ezeiza y se alimentaron con comida estándar para ratones irradiada (GEPISA).

## Análisis Bioinformático

La Bioinformática es una disciplina que integra la ciencia computacional, matemáticas y métodos estadísticos para administrar y analizar la información biológica. Un servicio de la bioinformática es la creación y la actualización de bases de datos con información biológica donde los investigadores pueden acceder a información existente y subir nuevos datos. En el presente trabajo se utilizó *The Cancer Genome Atlas Database* (TCGA, *The PAN Cancer Project, National Cancer Institute, USA*) para estudiar la expresión de FABP5 en aproximadamente 6000 tumores de 27 tipos de cáncer. La información obtenida de TCGA LUAD incluye 526 tumores y 59 tejidos adyacentes normales (NAT). Las muestras de NAT fueron removidas y la expresión génica HTSeq fpkm (fragmentos por kilobase de transcritos por millón de fragmentos mapeados) normalizados a  $\log_2(\text{fpkm} + 1)$ . La mediana de los niveles de expresión de FABP5

(ENSG00000164687.9) fue utilizada para dividir los tumores con alta y baja expresión de FABP5. Se graficó la información correspondiente a la supervivencia global y específica de la enfermedad. Los *packages* “survival” y “survminer” fueron utilizados para los análisis y la generación de gráficos en R. De forma complementaria se realizaron curvas de Kaplan-Meier utilizando *The Human Protein Atlas* con datos de RNA Seq obtenidos de tumores de pacientes con cáncer de pulmón de TCGA. Adicionalmente, se analizó el perfil de expresión de FABP5 y el enriquecimiento funcional asociado a esta proteína en líneas celulares tumorales con la base de datos pública *The Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE, Broad Institute, MA, USA)*. Estos estudios se realizaron en colaboración con el Dr. Ezequiel Lacunza (CINIBA, UNLP, Argentina).

### Cultivo celular

La línea celular de LUAD, A549 fue cedida gentilmente por el Dr. Boris Rodenak (INIBIOLP, UNLP/CONICET, Argentina) y la línea CaLu-6 proveniente del mismo tipo de cáncer fue donada por la Dr. Silvia De La Barrera (Instituto de Medicina Experimental, IMEX ANM - CONICET). La línea de monocitos, THP-1, y las líneas de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, fueron obsequios de la Lic. Gabriela Finarelli y el Dr. Mauro Montanaro (ambos del INIBIOLP, UNLP/CONICET, Argentina), respectivamente. Las líneas celulares Wi-38 (fibroblastos normales) y HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino) se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA).

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM, con 10% de FBS previamente inactivado durante 1 hs a 56°C, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, 100 UI/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomicina, 1% solución de vitaminas para MEM. Las condiciones de cultivo fueron 37°C de temperatura, en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. Rutinariamente las células se subcultivaron utilizando tripsina-EDTA (0,25%). El mantenimiento celular fue realizado en condiciones de elevada concentración de glucosa (25 mM). Para los experimentos, en cambio, las células fueron crecidas por una semana en medio con baja concentración de glucosa (5,5 mM), concentración fisiológica de la misma.

Regularmente se determinó el número de células mediante el recuento en cámara de Neubauer. La viabilidad celular se estimó utilizando el colorante azul de Tripán que se basa en la integridad de las membranas en células vivas que permite la exclusión del colorante [176].

## Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis se basa en la migración de partículas cargadas al ser sometidas a un campo eléctrico. La electroforesis en gel de agarosa permite la separación y purificación de fragmentos de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que, por su carga negativa, se desplazan del cátodo al ánodo a través del polímero de agarosa. Dado que la relación carga/masa se mantiene constante en las moléculas de ADN o ARN, la separación ocurre según su tamaño o forma. En el presente trabajo se agregó buffer de carga (30% v/v Glicerol, 0,2% p/v azul de bromofenol) a las muestras de ADN y se sembraron en geles de agarosa (1-1,2%) en buffer TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM). Los geles se tiñeron previamente con Syber Safe, un intercalante del ADN que permite revelar las bandas presentes en el gel utilizando una lámpara UV al finalizar la electroforesis. La utilización de marcadores de peso molecular permitió la determinación del tamaño de cada fragmento obtenido.

## Obtención de bacterias competentes

Para la amplificación de ADN plasmídico es necesario la incorporación del mismo en bacterias. El siguiente protocolo se realizó en bacterias *Escherichia coli* XL1 Blue para inducir un estado de competencia que permite la captación de ADN y la transformación subsiguiente. Una colonia bacteriana aislada se creció en 2,5 ml de medio de cultivo Luria Bertani (LB) y se incubó toda la noche a 37°C con agitación 225 rpm. Posteriormente, el cultivo se inoculó en 250 ml de LB con 20 mM MgSO<sub>4</sub> y se mantuvo a 37°C con agitación hasta obtener una DO<sub>600nm</sub> (densidad óptica) de 0,5. Se centrifugó el cultivo, 4500 rpm por 5 minutos a una temperatura de 4°C, y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 100 ml de buffer TBFI frío (acetato de potasio 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, RbCl 100 mM, 15% glicerol, pH 5,8 con ácido acético 1 M y esterilizado por filtración) y se incubó la suspensión 5 minutos en hielo. Nuevamente se centrifugó a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 10 ml de buffer TBFI (MOPS 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, RbCl 10 mM, 15% glicerol, pH 6,5 con KOH 1 M) y se incubó por 15 minutos en hielo. Las alícuotas de la suspensión de bacterias competentes se almacenaron a -80°C.

## Generación del vector de expresión pcDNA-hFABP5

La construcción de un vector de expresión de FABP5 humana fue realizada utilizando el plásmido pcDNA3.1+ que permite la expresión de proteínas de forma estable en

células de mamíferos. Este plásmido tiene un tamaño de 5,4 kb, contiene un origen pUC que permite la replicación y el crecimiento en *Escherichia coli* y el gen de resistencia a ampicilina que posibilita la selección de las colonias positivas luego de la transformación en bacterias competentes. El promotor de citomegalovirus se encuentra ubicado “río arriba” del sitio múltiple de clonado que posee numerosos sitios de corte de enzimas de restricción facilitando la inserción del gen de interés. Posteriormente se encuentra la región poli A derivada de la hormona de crecimiento bovina (BGH), que proporciona una terminación efectiva de la transcripción y la estabilidad del RNA mensajero. El vector pcDNA3.1 + posee el gen *neo* que codifica una aminoglicósido 3'-fosfotransferasa capaz de inactivar la geneticina y por lo tanto confiere resistencia a dicho antibiótico. El promotor y la región poli A de SV40 permiten la transcripción del gen *neo*. El plásmido contiene además un origen de replicación de SV40 que permite la replicación episomal en células eucariotas. El promotor T7 se encuentra al inicio del sitio múltiple de clonado y permite la transcripción *in vitro* del gen clonado (Figura 4 A).

Con el objetivo de generar el plásmido de expresión pcDNA3.1-hFABP5 se amplificó el cADN de hFABP5 (Gene Id 2171) presente en el plásmido pDNR-LIB-hFABP5 a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica de PCR se basa en la replicación *in vitro* de un fragmento de ADN específico utilizando una polimerasa termoestable. Consiste en la realización de ciclos caracterizados por diferentes temperaturas donde se produce la desnaturalización del ADN, unión de cebadores y replicación. El producto de cada ciclo es el sustrato del ciclo siguiente, de esta forma la repetición de los ciclos genera múltiples copias del fragmento de ADN delimitado por los cebadores.

Utilizando el *software* FastPCR se diseñaron cebadores específicos para el cADN de FABP5 con el agregado de sitios de corte para las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*. F: TTAAGCTTACCAGGCCACAGTTCAG, R: TAGAATTCTCCTGCAAAGTGATGATG. Con dichos cebadores se realizó la PCR utilizando la enzima Platinum *Pfx* ADN Polimerasa para la amplificación, siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de PCR, con los sitios de corte para las enzimas mencionadas en los extremos, se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa con el tamaño esperado (450pb). La purificación del fragmento se llevó a cabo directamente del gel, en columnas para separación de ADN mediante centrifugación y compresión del gel. Se obtuvo el ADN y se purificó mediante precipitación con etanol.

Los extremos cohesivos necesarios para la posterior ligación se generaron mediante la digestión con *EcoRI* y *HindIII* del cADN de FABP5 y el plásmido pcDNA3.1. Los

productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se purificaron directamente del gel como se describió previamente.

Utilizando la enzima T4 ADN Ligasa, y siguiendo las instrucciones del fabricante, se subclonó el cADN de FABP5 en el plásmido pcDNA3.1. Bacterias XL1 Blue competentes, generadas como se describió previamente, se transformaron con el producto de la ligación mediante la técnica de shock térmico. Brevemente, las bacterias con el ADN se incubaron 30 minutos en hielo y 90 segundos a 42°C. Posteriormente se mantuvieron a 37°C por 2 hs con medio LB para su recuperación, se plaquearon en medio sólido LB agar con el antibiótico de selección (Ampicilina) y crecieron toda la noche a 37°C. Las colonias positivas se cultivaron en medio LB líquido con el mismo antibiótico durante una noche. Se aisló y purificó el ADN plasmídico del cultivo bacteriano líquido mediante kit comercial para miniprep siguiendo el protocolo del fabricante.

Se confirmó la presencia e identidad del cADN de FABP5 en el ADN obtenido de las colonias transformadas mediante PCR y secuenciación (Figura 4 B).

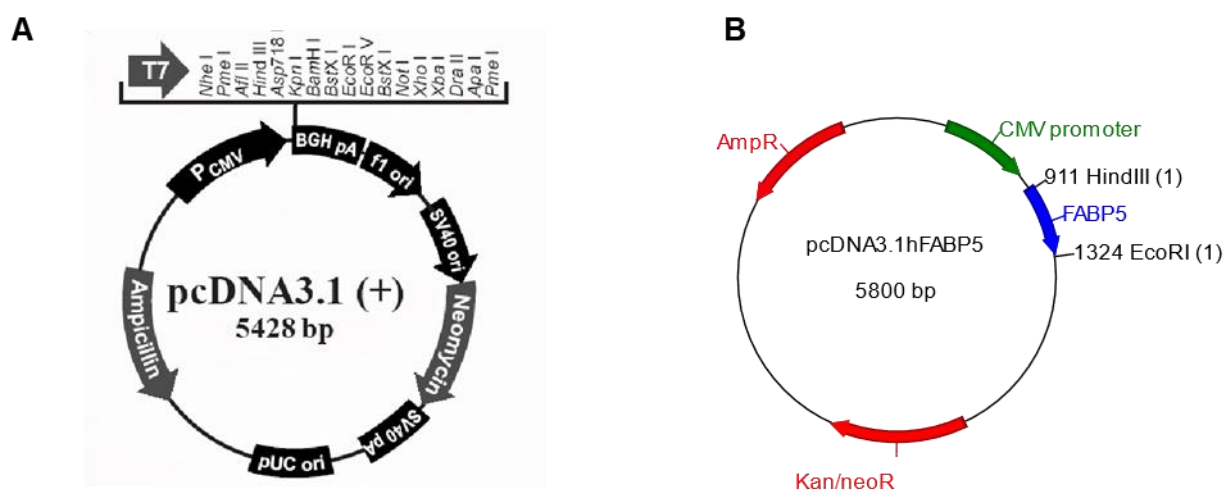


Figura 4: A) Esquema del vector pcDNA3.1 + y del vector generado pcDNA3.1-hFABP5.

## Transfección

La transfección es la introducción de material genético al interior de células eucariota. El método utilizado en este trabajo es la lipofección basado en la interacción electrostática de los ácidos nucleicos con la lipofectamina, un reactivo compuesto por



lípidos policatiónicos. El complejo generado permite el ingreso de los ácidos nucleicos en células en cultivo.

El modelo celular con aumento de la expresión de FABP5 se generó mediante la transfección estable de células A549 con el plásmido pcDNA3-hFABP5 y como control se utilizó el plásmido pcDNA3.1. La transfección estable implica el ingreso del ADN a la célula y la incorporación del mismo en el genoma, transmitiéndose a las generaciones siguientes. Se utilizó Lipofectamina LTX Reagent Plus como agente de transfección siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron un millón de células A549 en una placa de Petri de 60 mm, al día siguiente las células presentaban un 90% de confluencia y se transfectaron con una relación 1:3 (p/p) de plásmido: lipofectamina en medio sin suero ni penicilina/estreptomicina. Posteriormente, las células que incorporaron el plásmido se seleccionaron mediante la exposición a geneticina 1 g/l durante 20 días. La concentración de geneticina necesaria para la selección estable se determinó experimentalmente mediante “curvas de muerte” (*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th Edition, R. Ian Freshney, John Wiley & Sons*).

Con la finalidad de generar el modelo celular *knockdown* de FABP5 se utilizaron RNA pequeños de interferencia (siRNA) dirigidos hacia el RNA mensajero de FABP5 y un pool de siRNA que no presenta secuencias blanco en el transcriptoma humano como control. Para la transfección transitoria de células A549 con los siRNA se utilizó Lipofectamina RNAiMax, diseñada específicamente para movilizar siRNA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de concentración de los siRNA y el tiempo en el que se encuentran reducidos los niveles de FABP5 se determinaron para la línea celular A549.

### Ensayos de inhibición de FABPs

Células pre confluentes fueron incubadas por 24-48 horas con 50-150  $\mu$ M del inhibidor pan- específico de FABPs, HTS01037 [177] o vehículo dimetilsulfóxido (DMSO), según se detalla en cada experimento. De forma complementaria se realizó un ensayo con distintas concentraciones de un inhibidor específico de FABP5 y FABP7, SBF126 [178]. Células pre confluentes se incubaron por 24 hs con 6,25; 12,5; 25; 50 o 100  $\mu$ M de SBF126 o vehículo (DMSO 1%).

## Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó para estimar la masa de células en distintos ensayos y normalizar las determinaciones, como también, para establecer el volumen de muestra necesario para sembrar en un gel de poliacrilamida y detectar las proteínas deseadas mediante Western Blot (ver más adelante). El método de Bradford se basa en la interacción del colorante Coomassie brillante G250 con las proteínas que produce un cambio en el espectro de absorbancia de 470 nm a 595 nm. Para determinar la concentración de proteínas en las muestras es necesario utilizar una curva estándar. Se añadieron 250 µl de reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue 0,01% p/v, etanol 4,7% p/v, ácido fosfórico 8,5% p/v) y 5 µl de cada muestra o de diluciones de BSA (1 g/l; 0,8 g/l; 0,6 g/l; 0,4 g/l y 0,2 g/l) para la curva estándar. La absorbancia a 595 nm se midió en un lector de placas (Thermo Scientific Multiskan) y se calculó la concentración de proteínas en las muestras.

## Electroforesis en gel de Poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS)

La separación de proteínas presentes en una muestra según su peso molecular se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes para la posterior inmunodetección específica por Western Blot (ver más adelante).

Para la electroforesis, las células se lisaron en buffer hipotónico (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP40) y *cocktail* de inhibidores de proteasas (Calbiochem) y se clarificaron por centrifugación. Se cuantificó la cantidad total de proteínas en el sobrenadante de la muestra utilizando el método de Bradford. Entre 30-50 µg de proteína se hirvieron por 10 minutos con el buffer de carga (Tris 0,3 M, glicerol 50% v/v, SDS 1% p/v, β-mercaptoetanol 25% v/v y azul de bromofenol 1% p/v), así las proteínas se desnaturalizaron y cargaron negativamente.

Los geles de poliacrilamida discontinuos se prepararon utilizando el equipo MiniProtean Tetra Cell (BioRad), con una zona de concentración con un 4% de acrilamida: Bis acrilamida a pH 6,8 y una zona de resolución de 12,5 o 15% acrilamida: Bis acrilamida a pH 8,8.

Las proteínas se resolvieron por electroforesis con buffer de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v, pH 8,3) a 100 V (por 20 minutos) y 200 V (por una hora). Durante el primer paso, las proteínas se concentraron en una región estrecha previa a la zona

de resolución. En el segundo paso, las proteínas migraron hacia el ánodo a través de los poros generados en el polímero de acrilamida de la zona de resolución, por lo tanto, aquellas proteínas de mayor peso molecular presentaron menor movilidad que las de bajo peso molecular.

### Western Blot

El Western Blot es una técnica para la detección de proteínas específicas en una muestra compleja luego de su separación por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

Utilizando el equipamiento MiniProtean Tetra Cell (BioRad), se transfirieron las proteínas separadas por electroforesis a una membrana de PVDF a 100 V por una hora con buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20% v/v, pH 8,3). Las proteínas se desplazaron del gel a la membrana quedando inmovilizadas. Posteriormente, la membrana se bloqueó por una hora con leche descremada 5% p/v en PBS Tween (NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, 0,05% Tween), se lavó y se incubó con los anticuerpos primarios (en PBS Tween con 5% p/v BSA) toda la noche a 4°C con agitación. Luego de realizar lavados con PBS Tween, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) correspondiente en PBS Tween con 1% p/v leche descremada por 1-2 hs a temperatura ambiente, con agitación. Las bandas obtenidas se revelaron con Super Signal West Pico, sustrato quimioluminiscente de la HRP.

En la electroforesis se corrió simultáneamente un standard de peso molecular coloreado (Precision Plus Protein Dual Color Standard) que evidenció la transferencia de las proteínas a la membrana y permitió estimar el peso molecular de las bandas reveladas.

### Extracción de lípidos

Los lípidos celulares se extrajeron de acuerdo con el método de Bligh & Dyer [179] con modificaciones. Las monocapas celulares se lavaron con PBS frío de forma tal de eliminar cualquier lípido proveniente del FBS presente en el medio de cultivo. Las células se removieron de la placa de Petri con dos sucesivos agregados de 1 ml de metanol frío y raspado con un *scraper*. En los siguientes pasos se mantuvo constantemente a las muestras en hielo y los tubos utilizados fueron de vidrio con tapa de teflon. Para comenzar la extracción se adicionó 1 ml de cloroformo, 0,5 ml de agua y se incubaron las muestras toda la noche a -20°C. Luego de una centrifugación a 2000 rpm por 10

minutos, se guardó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 ml de metanol: cloroformo (2:1 v/v) y 0,5 ml de agua para una segunda extracción. Se realizó una incubación de 2 hs a -20°C, se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos y se colectó el sobrenadante junto con la primera extracción. El resultado fue una solución homogénea que contiene los lípidos celulares, se adicionó 1 ml de cloroformo y 1 ml de agua para la partición. Después de vortexear y centrifugar, se separaron una fase acuosa, una interfase proteica y una fase orgánica. La fase orgánica fue extraída y almacenada a -20°C.

### Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina se utilizó para la separación de las distintas clases de lípidos celulares basándose en su afinidad relativa por la fase estacionaria (adsorbente polar) y por la fase móvil (sistema de solventes).

Las placas de sílica se realizaron en un soporte de vidrio donde se esparció una suspensión de sílica en agua (2 ml de agua por cada gramo de sílica), que funcionó como adsorbente, y sulfato de calcio para adherirse al soporte. Se utilizó un instrumento diseñado para asegurar el espesor de la placa y se fijó en 0,5 mm. Una vez secas, las placas de sílica se limpiaron con acetona por capilaridad en una cuba saturada del solvente y se secaron a 80°C por una hora para deshidratarlas. Posteriormente, se sembraron las muestras de lípidos y se corrieron en una cuba saturada con la mezcla de solventes para lípidos neutros, hexano: dietiléter: ácido acético (80:20:2 por vol). Se corrió en paralelo un extracto de lípidos de hígado de rata o estándares comerciales para identificar las clases de lípidos separadas en la TLC, y se revelaron las bandas mediante exposición a vapores de iodo.

Adicionalmente, en los ensayos de marcación radioactiva, las bandas se detectaron utilizando un scanner de radioactividad (Storm). Finalmente, se rasparon los lípidos de la placa y se cuantificaron en contador de centelleo líquido Wallac Rack Beta 1214.

### Saponificación y esterificación de FA

Los lípidos extraídos de las células pueden ser simples o complejos, tener alto peso molecular o ser muy polares para algunos procedimientos como la cromatografía gas líquida (ver más adelante). Para el análisis de los FA que componen los lípidos celulares se realizó la saponificación de los mismos. Este procedimiento implica la hidrólisis en medio básico liberando los FA de los lípidos acilados.

Las muestras de lípidos se hidrolizaron con 2 ml de KOH 10% p/v en etanol a 80°C por 45 minutos en atmósfera de nitrógeno para evitar su oxidación. Se agregaron 3 ml de hexano, seguido de centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos. La fase superior conteniendo los lípidos insaponificables se descartó (o se guardó para su cuantificación, ver "Ensayos de marcación radioactiva") y se agregó 0,5 ml de ácido clorhídrico y 3 ml de hexano. Se centrifugó nuevamente 2000 rpm por 10 minutos, la fase superior (que contiene los FA libres) se conservó y en la fase inferior se repitió el agregado de hexano para una segunda extracción. Ambas extracciones se unificaron y se almacenaron a -20°C.

A continuación, se prepararon los ésteres metílicos derivados de FA que son relativamente volátiles. Los FA se esterificaron con 2 ml de 10% BF<sub>3</sub> en metanol a 64°C por 3 hs en atmósfera de nitrógeno para evitar su oxidación. Al enfriarse, se particionó la muestra con 1,5 ml de agua y 3 ml de cloroformo y luego de una centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos, se descartó la fase superior (agua, metanol y BF<sub>3</sub>). Se realizó un lavado con 3 ml de agua y la fase orgánica se almacenó en un tubo limpio para el posterior análisis.

### Cromatografía gas líquida

En la cromatografía gas líquida los compuestos volatilizados pasan en una corriente de un gas inerte (fase móvil) a través de una columna líquida (fase estacionaria). Los FA se separan según su coeficiente de partición, que depende de su volatilidad y la solubilidad en la fase estacionaria. Los componentes emergen de la columna al detector obteniéndose picos individuales cuya área bajo el pico está relacionada directamente con la masa del componente. El tiempo desde la inyección hasta el máximo de cada componente es el tiempo de retención que permite identificarlo utilizando un estándar.

La determinación de los FA que componen los lípidos extraídos de las células se llevó a cabo mediante cromatografía gas líquida. Se sembraron 350000 células en placas de Petri de 60 mm, 6 placas para cada línea/tratamiento. 48 hs después se rasparon las células y se extrajeron los lípidos como se describió anteriormente. Las muestras de lípidos provenientes de 2 placas se unificaron, entonces, 3 muestras por tratamiento/línea se saponificaron y esterificaron como se describió previamente. El solvente se evaporó y se resuspendieron los lípidos de cada muestra en 10 µl de hexano filtrado. Las muestras se inyectaron en el cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 6890 que contiene una columna Omega Wax 250 (Sulpeco Omegawax 250) de 30 m de longitud, 0,25 ID. Las condiciones del análisis fueron: el inyector en modo Split a 260°C,

la temperatura inicial del horno fue de 175°C por 3 minutos, una rampa de 3°C/minuto y una temperatura final de 230°C por 11 minutos y el detector de ionización por llama a 260°C. El gas *carrier* utilizado fue Helio a un flujo de 1,5 ml/minuto. Los picos obtenidos se identificaron mediante la comparación con los tiempos de retención de un standard de FA puros y se calculó el porcentaje de distribución mediante la integración del área correspondiente a cada pico.

Adicionalmente, se estimó el contenido de FA total en cada muestra de lípidos agregando 4 µg de ácido heptanoico como estándar interno. Los resultados se normalizaron por el contenido de proteínas totales cuantificadas por Bradford.

### Purificación de ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico

Para asegurar la pureza del ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico en los ensayos de oxidación, se sembró en una TLC en paralelo con un estándar puro y se corrió con la mezcla de solventes hexano: dietiléter: ácido acético (80:20:2 por vol.) como se describió anteriormente. La banda observada en el scanner de radioactividad a la altura de los FA libres del estándar se raspó de la placa. El raspado se colocó en un tubo con etanol: cloroformo en partes iguales (v/v) y se incubó toda la noche a -20°C para la primera extracción. Luego de una centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos se separó el sobrenadante en un tubo nuevo y se realizó una segunda extracción agregando nuevamente etanol: cloroformo en partes iguales al pellet. Se incubó una hora a -20°C y se centrifugó nuevamente, el sobrenadante se sumó a la primera extracción. Para eliminar la mayor cantidad de sílica posible se realizó una última centrifugación por 10 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante conteniendo el ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico se utilizó en los ensayos de oxidación de FA.

### Ensayos de marcación radioactiva

Un método sensible para rastrear el destino de una molécula biológica es la detección de la radioactividad emitida por radioisótopos introducidos en la molécula. Los compuestos marcados con radioisótopos tienen las mismas propiedades químicas que el correspondiente compuesto no marcado y son metabolizados de la misma forma.

### Incorporación de ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico y [<sup>14</sup>C] acetato

En el presente trabajo se utilizaron ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico y [<sup>14</sup>C] acetato para evaluar el destino de los FA exógenos y los sintetizados *de novo* respectivamente. Células pre confluentes se incubaron por 4 hs con 0,5 µCi [1-<sup>14</sup>C] ácido palmítico complejoado con 0,5% BSA libre de FA o [<sup>14</sup>C] acetato por placa de Petri según corresponda. El medio condicionado se conservó como medida de la marca radioactiva no incorporada en las células. La monocapa de células se lavó 2 veces con 0,2% BSA libre de FA en PBS frío (para eliminar los FA adsorbidos a la superficie celular) y se raspó con *scraper* utilizando dos agregados sucesivos de 1 ml de metanol. Los lípidos celulares se extrajeron como se describe anteriormente. Se cuantificó la radioactividad incorporada en contador de centelleo líquido. El destino de los compuestos radioactivos estudiados se evaluó mediante cromatografía de capa fina, como se detalló previamente. Adicionalmente, en el ensayo de incorporación de [<sup>14</sup>C] acetato se realizó la hidrólisis en medio básico de los lípidos extraídos (como se describió previamente) y se cuantificó la marca radioactiva en lípidos insaponificables.

### Captación de ácido palmítico

La medida de la internalización de ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico en las células se realizó mediante la incubación por un minuto con la marca radioactiva y posterior cuantificación. Se sembraron células A549 en *transwells* de 0,4 µm de poro y se trataron con HTS01037 100 µM o con el vehículo (DMSO) por 24 hs. A continuación, las células se incubaron por 1 minuto con 0,5 µCi [1-<sup>14</sup>C] palmítico y se realizaron dos lavados consecutivos con BSA libre de FA 0,2% PBS. Finalmente se extrajo la membrana del *transwell* y se cuantificó la radioactividad en las células utilizando el contador de centelleo líquido.

### Oxidación de FA

La oxidación completa de FA se estimó midiendo el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> producido por las células luego de la incubación con ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico [180]. Células pre confluentes, cultivadas en una placa de 24 *wells*, se incubaron por 6 hs con 0,3 µCi [1-<sup>14</sup>C] ácido palmítico complejoado con 0,5% BSA libre de FA por *well*. Al cumplirse el tiempo, en cada *well* se agregó 50 µl de ácido perclórico 70% y se colocó rápidamente un papel absorbente embebido en NaOH 3 M cubriendo el *well*. La placa fue sellada con papel film y se incubó a temperatura ambiente por 2 hs con agitación. Finalmente se cuantificó la radioactividad presente en el papel en contador de centelleo líquido. Simultáneamente

se procesaron *wells* sin células y la medida obtenida se utilizó como blanco, restándose al resto de las muestras.

### Secreción de Surfactante

La secreción de surfactante pulmonar se cuantificó en un ensayo de pulso y caza con ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico. Se sembraron 200000 células, se realizó un pulso de 24 hs con 0,25 µCi ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico complejo con 0,5% BSA libre de FA por placa de Petri y se guardó el medio de incubación como medida de la marca radioactiva no internalizada. La monocapa celular se lavó dos veces con PBS 1X 0,2% BSA libre de FA para retirar el remanente de FA radioactivo y se procedió a mantener las células por 24 hs en 2,5 ml de medio completo por placa de Petri, el cual se denominó medio de caza. Finalmente, se cuantificó la radioactividad presente en los lípidos extraídos de 500 µl del medio de caza y se analizó por cromatografía en capa fina las diferentes clases de lípidos secretados.

### Secreción de Lactato

Los niveles de lactato se midieron utilizando un kit comercial con un estándar de lactato de calcio. El fundamento del método es la oxidación del lactato presente en la muestra por la enzima lactato oxidasa produciendo peróxido de hidrógeno. A continuación, la enzima peroxidasa utiliza el peróxido de hidrógeno para generar un cromógeno que puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 545 nm. Brevemente, se tomó el medio condicionado de 24 hs de células pre confluentes y se centrifugó para descartar células o restos celulares. En una placa *multiwell* de 96 se incubaron por 2 minutos a 37°C 2 µl de cada muestra con 175 µl del reactivo A (TOOS 3,5 mM; ascorbato oxidasa (pepino) ≥ 30 U/ ml; buffer fosfato 100 mM pH 7,8, azida sódica < 0,1%). Cumplido el tiempo se realizó una primera medida de la absorbancia a 545 nm y se agregó el reactivo B (4-aminoantipirina 5 mM; lactato oxidasa ≥ 10 U/ml; peroxidasa (rábano picante) ≥ 24 U/ml; buffer fosfato 100 mM pH 7,8, azida sódica < 0,1%). Luego de 5 minutos a 37°C se realizó la segunda medida de absorbancia a 545 nm. Simultáneamente se ensayaron distintas concentraciones de estándar (0,008; 0,016; 0,032; 0,065; 0,13; 0,27 mM lactato). Se calculó la concentración de lactato en cada muestra restando los valores de la primera medida de absorbancia considerada "blanco" a cada valor y utilizando la curva estándar. La concentración de lactato se normalizó por la cantidad de proteína total cuantificada por el método de Bradford.



## Fraccionamiento celular

La obtención de la fracción citoplasmática de las células y la fracción nuclear permite la detección de proteínas localizadas en diferentes compartimentos celulares. Células A549 fueron recolectadas con tripsina y lavadas con PBS frío por centrifugación. El pellet se resuspendió en 500  $\mu$ l buffer hipotónico (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM  $MgCl_2$ ) y se incubó en hielo por 15 minutos para la lisis celular. Se adicionaron 25  $\mu$ l de detergente NP40 10%, se colocaron 10 segundos en vortex y el homogenato se centrifugó a 4°C por 10 minutos con una velocidad de 3000 rpm. El pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l del buffer de extracción (10 mM Tris, pH 7,4, 2 mM  $Na_3VO_4$ , 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM EGTA, 0,1% SDS, 1 mM NaF, 0,5% deoxycholate, 20 mM  $Na_4P_2O_7$ , cocktail inhibidor de proteasas), se mantuvo en hielo por 30 minutos agitándose en vortex cada 10 minutos. El producto se centrifugó a 4°C por 30 minutos a una velocidad de 14000 g. El sobrenadante contiene la fracción citoplasmática y el pellet la fracción nuclear.

## Ensayo reportero de luciferasa

Para estudiar la activación de los elementos regulatorios que controlan la expresión de genes de interés, se utilizaron ensayos de genes reporteros. La técnica se basa en la fusión de la secuencia regulatoria a un gen reportero, así, la expresión del mismo está directamente relacionada con la actividad del elemento regulatorio. En el presente trabajo se evaluó la activación del elemento de respuesta a PPARs (PPRE) con el plásmido pGL4-PPRE obsequio del Dr. Bennet. En la figura 5 se puede ver el mapa del plásmido basado en el pGL4.26 de Promega, contiene tres regiones PPRE DR1, de la región río arriba del gen de acil-CoA oxidasa, entre los sitios de corte de KpnI y HindIII en el sitio múltiple de clonado, antes de la región mínima promotora [181]. Como gen reportero se utilizó el gen de luciferasa, el cual codifica para una proteína de 61 kDa monomérica que no requiere modificaciones postraduccionales y no se encuentra en el sistema de estudio. La actividad del gen reportero se estima midiendo la luminiscencia producida por la luciferasa en una reacción que requiere luciferina, ATP, magnesio y oxígeno.

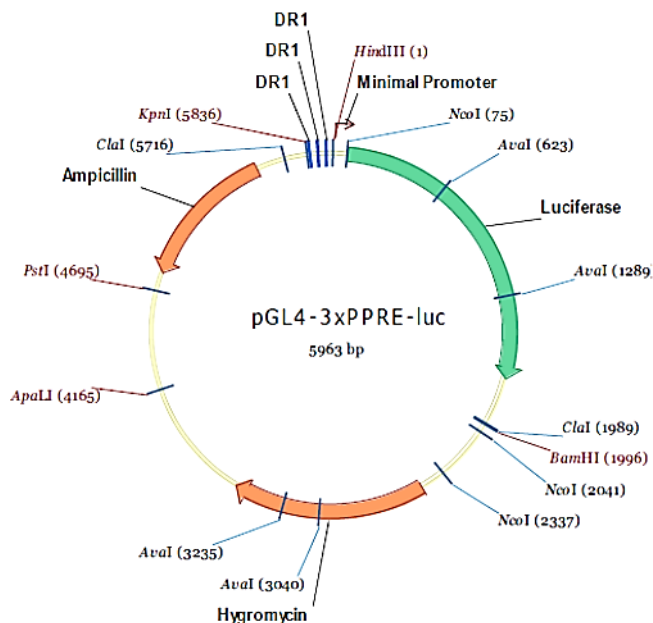


Figura 5: Mapa del vector reportero pGL4-3XPPRE-Luc obsequio del Dr. Bennet.

Para estudiar el rol de FABP5 en regulación de la expresión génica se ensayó la activación del PPRE mediada por cada una de las isoformas de PPAR presentes en las células A549 individualmente. Los plásmidos pcDNA3.1-mPPAR $\gamma$  y pCMX-mPPAR $\alpha$  se utilizaron para la sobre expresión de los factores de transcripción. Se sembraron 50000 células HeLa por *well* en una placa de 24 *wells* y a las 24 hs se transfectaron utilizando polietilenimina (PEI), un polímero catiónico, en una relación 5:1 con 1  $\mu$ g de pGL4 PPRE solo o conjuntamente con 0,5  $\mu$ g de pcDNA3.1-mPPAR $\gamma$  o pCMX-mPPAR $\alpha$ . La transfección se realizó en medio DMEM baja glucosa sin FBS. En 50  $\mu$ l de medio se colocaron los plásmidos correspondientes, la cantidad necesaria de PEI y se vortexeó por 10 segundos. Luego de una incubación de 15 minutos, los complejos se colocaron en los *wells* correspondientes. A las 24 hs se cambió el medio a DMEM baja glucosa completo. La detección de luminiscencia se realizó 48 hs post transfección con el kit Dual Glo Luciferase Assay System. Las células se levantaron con tripsina y se centrifugaron por 10 minutos a 10000 rpm, el pellet se lavó con PBS para eliminar el medio de cultivo que contiene rojo fenol e interfiere en la medida. Finalmente, se resuspendió el pellet en 50  $\mu$ l de PBS y se colocó en una placa de 96 *wells* blanca. Se agregó 50  $\mu$ l del reactivo del kit que contiene los sustratos para luciferasa y luego de una incubación de 10 minutos se midió la luminiscencia en un lector de placas (Beckman Coulter DTX 880 BD). Los valores se normalizaron con el contenido de proteína determinado en células que se sembraron en paralelo.

## Proliferación

### Curva de crecimiento

Una forma de evaluar cambios en la proliferación celular es realizar una curva de crecimiento. La curva de crecimiento celular está constituida por la fase “lag”, la fase exponencial y una fase estacionaria. Utilizando los datos de la curva se pueden determinar distintos parámetros como el tiempo de duplicación característico de una línea celular.

Se sembraron 20000 células por *well* en una placa de 24 *wells*, cada 24 hs se levantaron las células con tripsina y se realizó el recuento celular de 3 pocillos. La cuantificación del número de células se efectuó en cámara de Neubauer y se estimó la viabilidad celular con el colorante azul de Tripán [176]. Los valores de la curva se normalizaron al número de células determinado a las 24 hs de la siembra.

En los ensayos realizados con el modelo *knockdown* de FABP5 y el tratamiento con el inhibidor, se realizó el recuento celular con el mismo método a las 48 y 24 hs respectivamente.

### Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una técnica basada en el flujo de una suspensión de partículas y la medida de dispersión de luz y fluorescencia que se produce al incidir un haz de luz sobre ellas. Las partículas se mueven en fila, una tras otra, permitiendo la medida de múltiples parámetros de cada partícula en una población heterogénea. Una de las aplicaciones de la citometría de flujo es el análisis del ciclo celular por cuantificación del contenido de ADN: las células en fase S se encuentran duplicando el ADN por lo tanto tendrán mayor contenido que las células en fase G0-G1 y las células que se encuentren en las fases G2/M duplicaron el ADN. La identificación de la distribución en las distintas fases de ciclo celular se determinó mediante la tinción con yoduro de propidio, un colorante que se intercala en el ADN de forma estequiométrica. Simultáneamente, las células se marcaron con BrdU, un análogo de timidina, que se incorpora en el ADN durante la síntesis y se detecta con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo.

Células pre confluentes se incubaron por 2 hs con BrdU 10  $\mu$ M, se lavaron con PBS y se levantaron de la placa de Petri con tripsina. A continuación, se centrifugó la suspensión celular por 10 minutos a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 500  $\mu$ l de PBS y se pasó 3 veces por una jeringa con una aguja de 26 G para separar las células. A continuación, se fijaron las células a través del agregado

de 3 ml de etanol 70% por goteo al mismo tiempo que se vortexea la suspensión celular y se incuba por 20 minutos en hielo. Las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el procesamiento.

Para la detección de BrdU, se utilizó el protocolo de BD Biosciences, con modificaciones. Brevemente, las células fijadas se centrifugaron 10 minutos a 2000 rpm, se lavó el pellet con 3 ml de PBS y luego de otra centrifugación se resuspendió el pellet en 500  $\mu\text{l}$  de solución desnaturante (HCl 2 M preparado en el momento). Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente, se agregó 1 ml de buffer de lavado (PBS 0,5% BSA) a cada muestra y se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm descartando el sobrenadante. Se neutralizó algún resto de ácido resuspendiendo el pellet en 500  $\mu\text{l}$  de borato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0,1 M pH=8,5) e incubando 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las muestras con 1 ml de buffer de lavado y se centrifugaron nuevamente. Se incubaron con 50  $\mu\text{l}$  del anticuerpo anti-BrdU en PBS 0,5% Tween 0,5% BSA por 20 minutos y se repitió el lavado con 1 ml de buffer de lavado seguido de centrifugación. Se procedió a la tinción con yoduro de propidio, para lo cual, se resuspendió el pellet en 500  $\mu\text{l}$  de PBS, se agregó 50  $\mu\text{l}$  de RNAsa A y 5  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio (1mg/ml). Las muestras se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz y finalmente se analizaron en el citómetro de flujo BD Accuri C6 con el software del equipo.

### Violeta cristal

La tinción con violeta cristal permite valorar de una forma rápida y sencilla la masa total de un cultivo celular. El colorante está formado por compuestos orgánicos con carga positiva que se unen a los constituyentes celulares cargados negativamente. Las células se lavaron con PBS, se fijaron con metanol por 10 minutos y se tiñeron con violeta cristal 0,1% durante 10 minutos. Luego de tres lavados con agua se resuspendió el colorante en metanol 10%, ácido acético glacial 5% y se determinó la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (MultiScan). La medida de la absorbancia se relaciona directamente con la masa celular de la muestra. Se utilizó esta técnica para estimar la proliferación, adhesión y migración celular.

### Migración

El ensayo de la herida revela la capacidad migratoria *in vitro* de células en cultivo. Las células se cultivaron en placas de Petri de 60 mm hasta llegar a confluencia, en ese

momento se retiró el medio de cultivo y se realizó una estría utilizando una pipeta automática, un tip blanco y una regla. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y se agregó medio fresco. Las células se incubaron por 12 hs, se realizó la tinción con violeta cristal como se describió anteriormente y se fotografiaron al microscopio. La cuantificación se llevó a cabo con el software ImageJ [182].

## Adhesión

Para evaluar la capacidad de adhesión al sustrato, células en cultivo se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron 20000 células por *well* en una placa de 24 *wells*. Se realizó una incubación de 2 hs a 37°C y cumplido el tiempo de adhesión se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS cuidadosamente. Finalmente, se realizó la tinción con violeta cristal y se cuantificó la absorbancia en el lector de placas.

## Mantenimiento de Ratones

Ratones genéticamente atímicos “*nude*” (N:NIH Nu/Nu) se utilizaron para estudiar la relación de FABP5 con el desarrollo tumoral *in vivo*. Debido a su condición, los ratones *nude* son incapaces de rechazar heterotransplantes [183] y son utilizados para el estudio de tumores humanos. La ausencia de timo genera un compromiso severo de la inmunidad por lo que deben ser manipulados en condiciones de esterilidad.

Ratones *nude* hembra de 4-6 semanas se alojaron en cajas estériles con filtros de aire tipo HEPA, viruta como material de cama y un cilindro de cartón para enriquecimiento ambiental. Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con comida estándar para ratones esterilizada por radiación gamma por el proveedor y se permitió el libre consumo de agua acidulada (pH 2-3) autoclavada. Todas las manipulaciones se realizaron en una cabina de seguridad biológica Clase II.A con material estéril. Las cajas de alojamiento y las botellas con el agua de bebida se cambiaron dos veces por semana. Los animales se mantuvieron a 25°C con un ciclo de luz oscuridad de 12 hs-12 hs.

## Ensayo de desarrollo tumoral

El siguiente protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas UNLP (P01-05-2019). Ratones *nude* se aclimataron por una semana, se separaron de forma aleatoria en dos grupos y se inocularon de forma sub epidérmica con un millón de células en 100 µl de

PBS por ratón. Para el análisis de tumorigenicidad se utilizó la línea celular A549 pcDNA3.1-hFABP5 en un grupo de ratones y la línea A549 pcDNA3.1, control, en el segundo grupo. Los ratones se pesaron y se midieron los tumores con calibre una vez por semana. El volumen del tumor se calculó con la fórmula modificada para determinación del volumen de un elipsoide  $V = a^2 \times b \times 1/2$ , donde “a” es el ancho del tumor y “b” es la longitud en milímetros. Los volúmenes se relativizaron al volumen inicial de cada tumor: Volumen relativo= Volumen medido / Volumen inicial. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 2000 mm<sup>3</sup> se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical y se removieron los tumores para estudios posteriores.

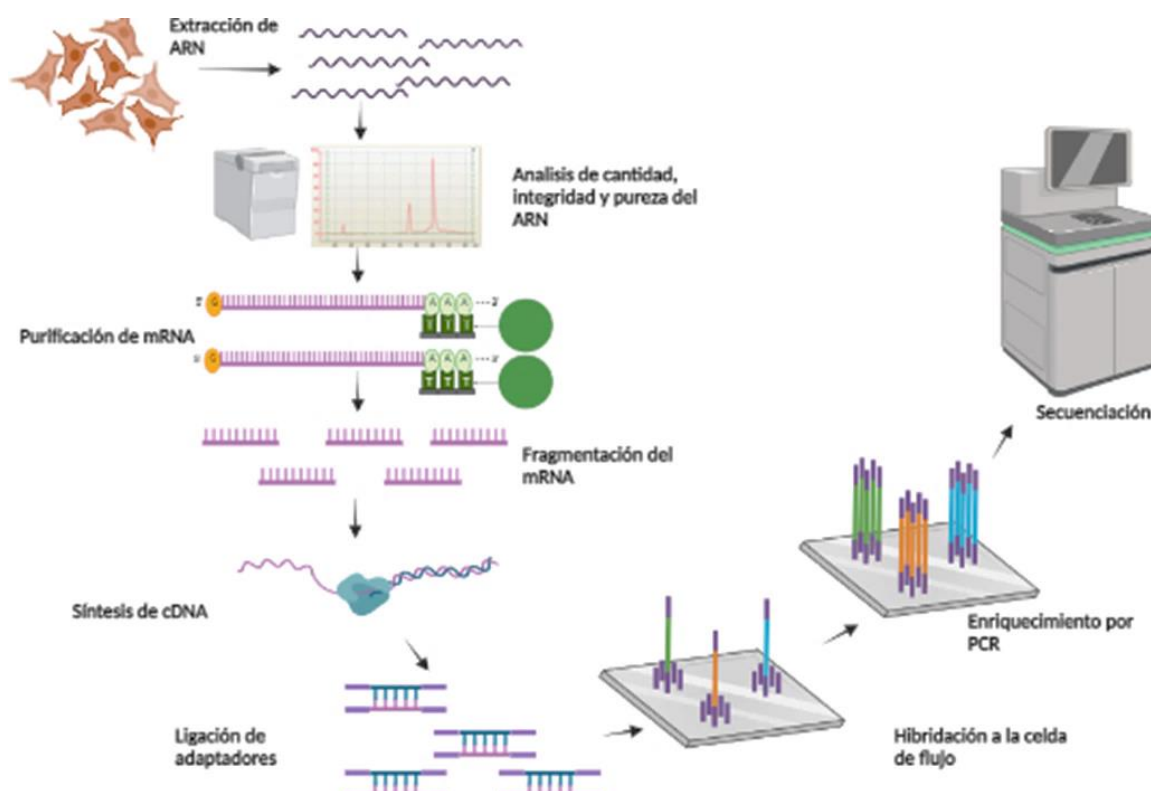
### Análisis transcriptómico

La extracción de ARN de células A549 se realizó con TriZol según las indicaciones del fabricante. El reactivo TRIzol mantiene la integridad del ARN gracias a la inhibición altamente eficaz de la actividad de ARNasas, al tiempo que destruye las células y disuelve los componentes celulares durante la homogeneización de muestras. A continuación, se añade cloroformo y se separa una capa acuosa superior (que contiene ARN) y en capas orgánica y de interfase inferiores (que contienen ADN y proteínas). Las soluciones utilizadas en el procedimiento fueron preparadas con agua tratada con dietil- pirocarbonato (DEPC) y los materiales se enjuagaron previamente con la misma solución para inactivar ARNsas. Brevemente, células crecidas en un 80% de confluencia en una placa de Petri de 60 mm se lavaron con PBS y se lisaron con 1 ml de Trizol. Luego de 5 minutos de incubación se agregaron 200 µl de cloroformo y se mezcló por inversión 15 veces. La suspensión se incubó 3 minutos y se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 12000 g para separar las fases. La fase acuosa, que contiene el ARN, se transfirió a un nuevo tubo estéril. 500 µl de isopropanol se adicionaron para precipitar los ácidos nucleicos, se incubó por 10 minutos y se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 12000 g. El pellet resuspendido en 1 ml de etanol 75% se centrifugó a 4°C por 5 minutos a 7500 g. Se descartó el sobrenadante y se evaporó el etanol restante. El ARN se guardó seco a -80°C.

Las muestras se enviaron a la empresa Macrogen donde la pureza, integridad y cantidad del ARN se evaluó usando un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Las librerías de cADN se generaron utilizando TruSeq stranded RNAkit (Illumina) que purifica y fragmenta el mARN, mediante la transcriptasa reversa genera el cADN y agrega adaptadores en los extremos de los fragmentos dejándolos preparados para la hibridación en una celda de flujo. La librería de cADN se enriqueció por PCR y se

purificó. La secuenciación (*pair end sequencing*) de los fragmentos de cADN se realizó en un NovaSeq 6000 System (Illumina). La figura 6 muestra un esquema del protocolo realizado.

Los productos obtenidos, previa remoción de los adaptadores y secuencias de baja calidad, fueron mapeados y alineados al genoma de referencia hg19 con HISAT2 y el ensamblaje de los transcritos se realizó con Stringtie. El perfil de expresión fue calculado para cada muestra y para cada transcripto. Los datos se normalizaron y se determinaron los genes diferencialmente expresados con DESeq2 [184], en colaboración con Daniel Minsky (Laboratorio Tandar, CNEA, Argentina). Aquellos genes cuyos niveles de expresión entre ambos grupos presentaron un p-valor y un FDR (tasa de falsos descubrimientos)  $< 0,05$  se consideraron diferencialmente expresados.



**Figura 6:** Protocolo de secuenciación de RNA total. Extracción de ARN total de células A549 en cultivo y análisis de la calidad, integridad y pureza del producto. Purificación del RNA mensajero, fragmentación y generación de la biblioteca de cADN. Ligación de adaptadores e hibridación a la celda de secuenciación, amplificación de los fragmentos de cADN y secuenciación de los mismos.

## Estadística

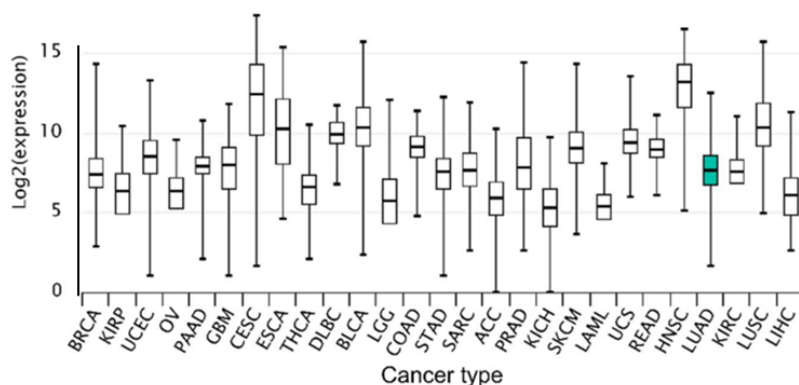
Los resultados de los ensayos se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar de al menos tres muestras. En caso de ser posible se estudió la normalidad de la población de valores obtenidos mediante el Test de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas con el Test de Bartlett. Los datos que mostraron una distribución normal y homogeneidad de varianzas fueron analizados por T-test o ANOVA seguido por un test de comparaciones múltiple, LSD test. En los ensayos en los que los datos no presentaron distribución normal u homogeneidad de varianzas se efectuó el test no paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon. Para el análisis de supervivencia, la comparación entre las curvas de Kaplan-Meier y la significación estadística se calculó mediante el test log-rank. Los análisis estadísticos se efectuaron en el software R (R Core Team 2017. R: A language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>).



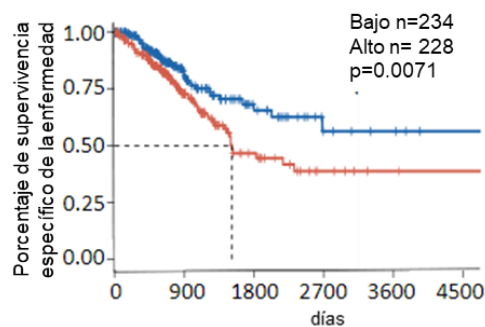
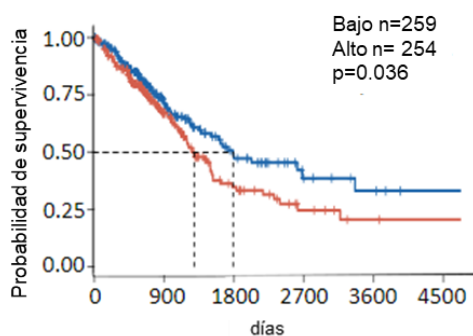
## RESULTADOS

La expresión de FABP5 ha sido vinculada con el desarrollo y progresión de distintos cánceres, especialmente mama y próstata [155-157, 163, 166, 167, 170, 185-187]. A fin de evaluar los niveles de expresión de FABP5 en LUAD en relación a otros cánceres, se analizaron datos provenientes de bases públicas de secuenciación masiva en ~6000 tumores humanos de 27 tipos de cáncer (TCGA). De acuerdo con la elevada expresión de FABP5 en epitelios escamosos, los mayores niveles de mRNA para esta proteína se observaron en tumores derivados de dichos tejidos, (carcinoma cervical de células escamosas (CESC), carcinoma de esófago (ESCA), carcinoma de vejiga (BLCA), Carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSC) y LUSC) (Figura 7 A). El nivel de expresión de FABP5 en LUAD fue comparable al de cáncer de mama (BRCA) y próstata (PAAD), en los cuales la participación de FABP5 en su desarrollo y progresión ha sido establecida. Además, altos niveles de FABP5 están asociados con una menor probabilidad de supervivencia en pacientes con LUAD (Figura 7 B y C). Esto es más notable al analizar los pacientes en estadios avanzados (III y IV) de la enfermedad (Figura 7 D). Contrariamente a lo observado para LUAD, en pacientes que padecen cáncer de pulmón de células escamosas con diferentes niveles de expresión de FABP5, no se observó diferencia en la supervivencia cuando se consideraron todos los estadios juntos (resultados no mostrados) o los estadios más avanzados (Figura 7 E).

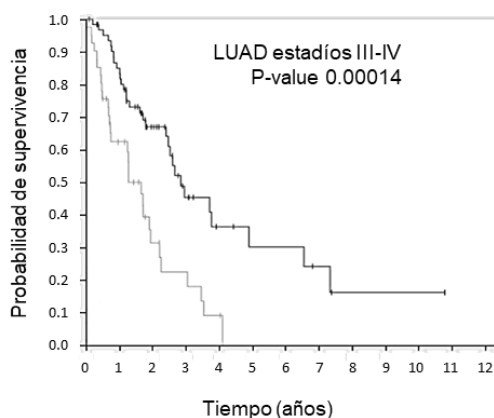
A



B



D



E

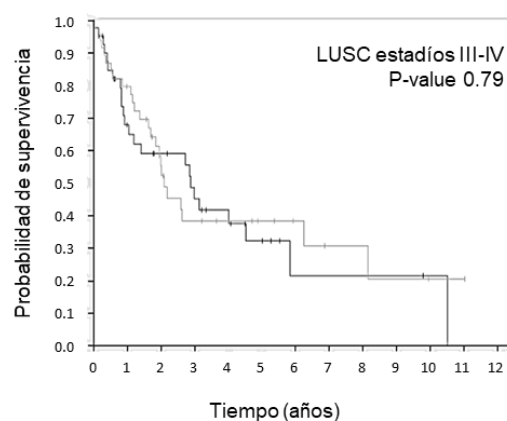
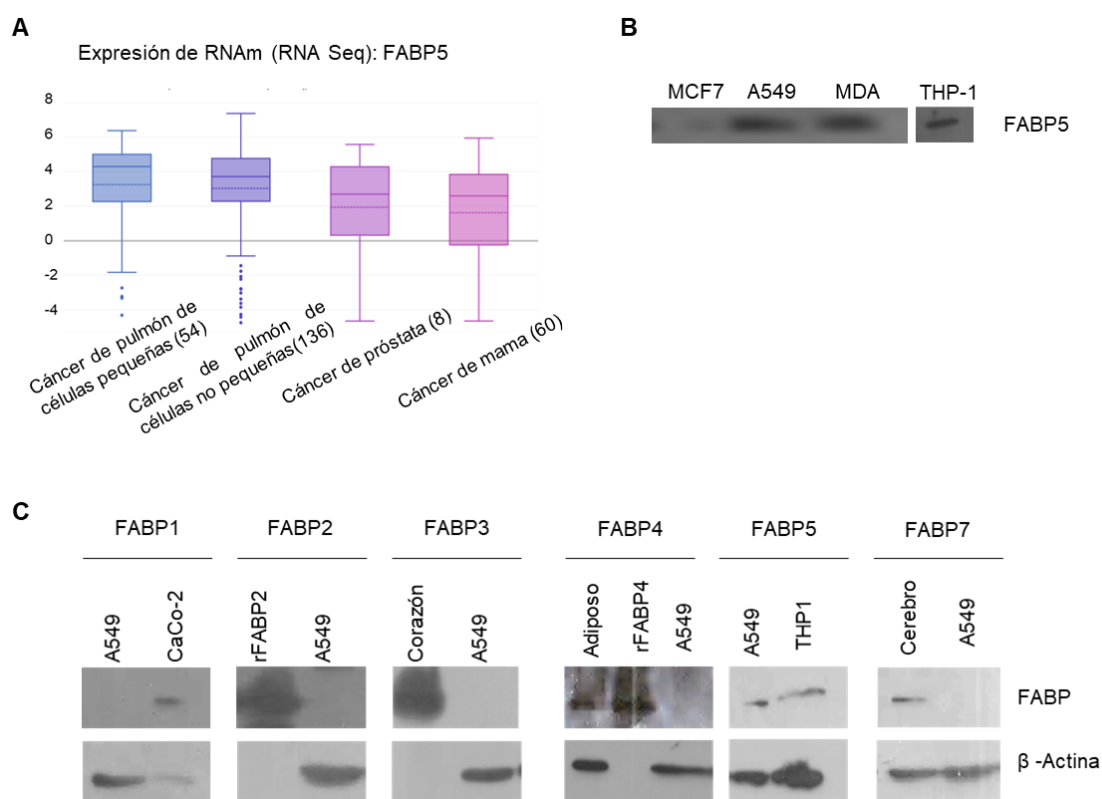


Figura 7: Caracterización de la expresión de FABP5 en tumores humanos: A) Box plots representando la expresión del gen FABP5 en un total aproximado de 6000 muestras del repositorio TCGA provenientes de 27 localizaciones tumorales (LUAD se indica con color verde). Los tipos de cáncer se abreviaron según TCGA (<https://gdc.cancer.gov/resources-tcga-users/tcga-code-tables/tcga-study-abbreviations>, Apéndice 1). B y C) Análisis de Kaplan-Meier realizado con datos provenientes de bases de datos públicas (TCGA LUAD). La mediana de los niveles de expresión de FABP5 fue utilizada para dividir los tumores con altos (rojo) y bajos (azul) niveles de FABP5 y la probabilidad de supervivencia global y de supervivencia específica de la enfermedad fueron graficados respectivamente. D y E) Análisis de supervivencia global de pacientes con LUAD (D) o LUSC (E) en estadios III y IV separados según los niveles de expresión de FABP5. Bajo: negro, Alto: gris (The Human Protein Database, n= 105 LUAD; n= 90 LUSC). El valor p se muestra en los gráficos, test log-rank.

Al evaluar los niveles de mRNA correspondiente a FABP5 en líneas celulares derivadas de NSCLC se encontró que son similares o mayores que en líneas de cáncer de próstata o mama (The Cancer Cell Line Encyclopedia, Broad Institute, MA, USA) (Figura 8 A). Igual que en los tumores, se observó mediante Western Blot en la línea celular A549, proveniente de LUAD humano, niveles de FABP5 mayores o iguales a las líneas derivadas de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF-7) (Figura 8 B). Además, el análisis de expresión de las distintas isoformas de FABPs en A549 reveló que no presentan niveles detectables de las isoformas 1,2,3,4 ni 7 de las FABPs (Figura 8 C), consistentemente con la expresión de mRNA (The Human Protein Database).

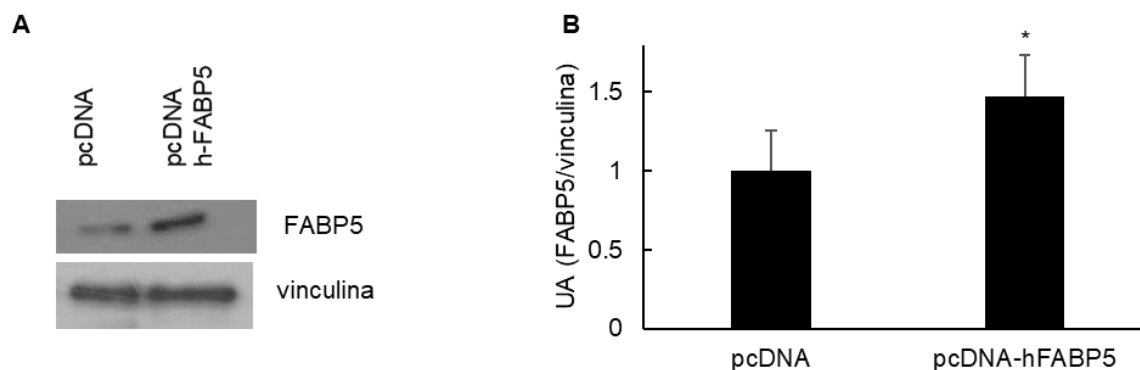


**Figura 8:** Expresión de FABP5 en líneas celulares. A) Representación de la expresión de FABP5 (mRNA) en líneas celulares derivadas de tumores humanos (entre paréntesis se incluye el número de líneas celulares analizadas de cada tipo de cáncer), de la base de datos The Cancer Cell Line Encyclopedia. B) Niveles de FABP5 evaluados por Western Blot en distintas líneas celulares tumorales: MCF-7 y MDA-MB-231 derivadas de cáncer de mama y A549, proveniente de un LUAD. Las células THP-1, procedentes de una leucemia monocítica, se utilizaron como control positivo. C) Caracterización de la expresión de las isoformas 1,2,3,4 y 7 de FABP en células A549 por Western Blot. Como controles positivos para cada isoforma se utilizaron: homogenatos de corazón (FABP3), cerebro (FABP7) y tejido adiposo (FABP4) de rata; proteínas recombinantes de rata purificadas (FABP2 y FABP4); y células de cáncer de colon CaCo-2 (FABP1) o THP-1 (FABP5).

Así, el análisis bioinformático realizado con bases de datos públicas, que poseen información transcriptómica de tumores humanos, sugiere que FABP5 está asociada a un peor pronóstico en pacientes con LUAD. La línea celular A549 presentó niveles considerables de FABP5 sin observarse la expresión de las otras isoformas de FABPs estudiadas, por lo tanto, fue utilizada para el estudio del rol de FABP5 en el metabolismo de lípidos.

## 1. Generación de modelos celulares con niveles alterados de FABP5

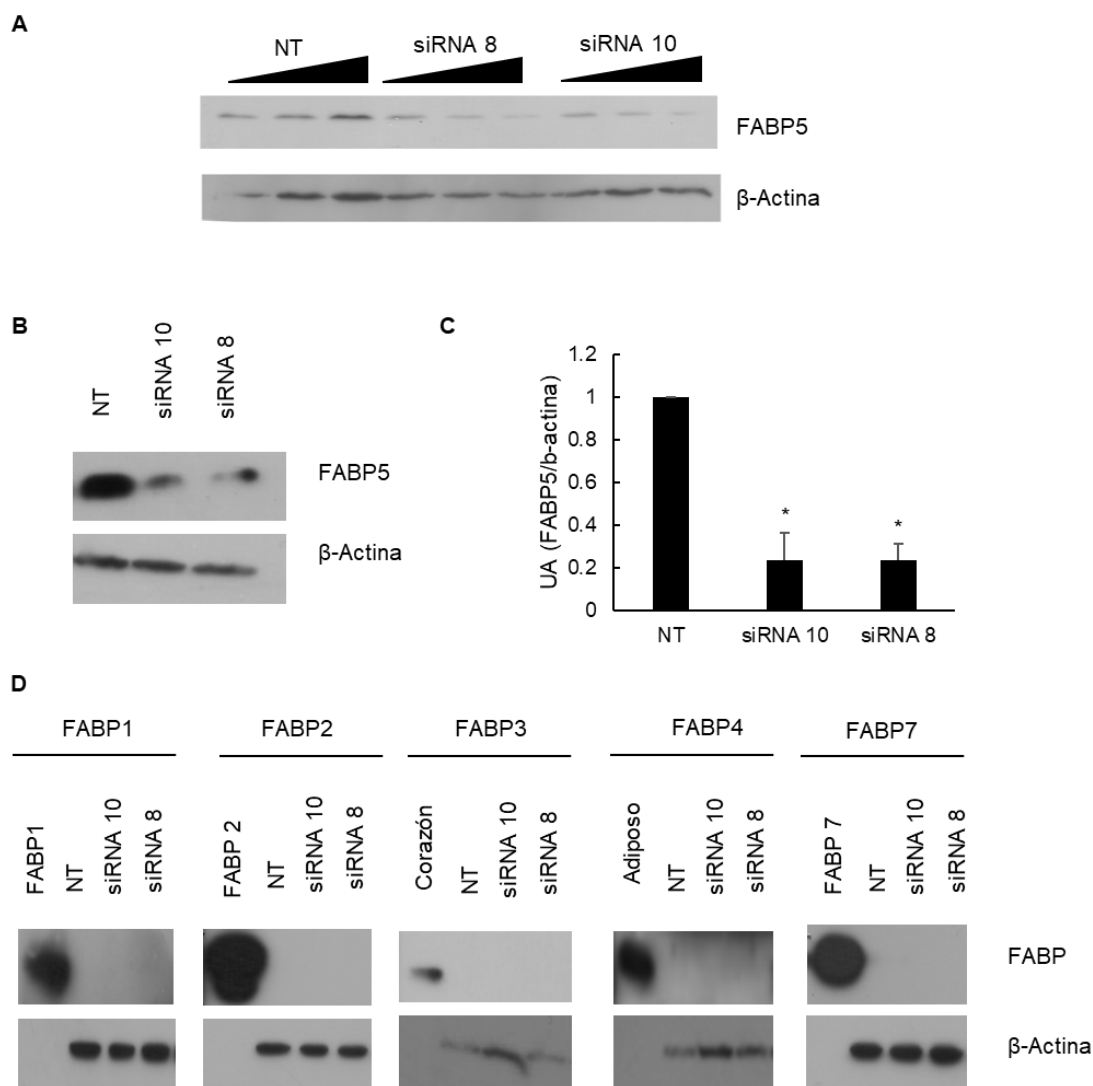
El primer objetivo del trabajo consistió en generar modelos celulares con niveles alterados de FABP5 a fin de evaluar su rol en el metabolismo lipídico y en el fenotipo neoplásico. Generamos un modelo de sobre expresión de FABP5 mediante la transfección estable de las células A549 con un plásmido de expresión eucariota pcDNA3.1 en el que se insertó el cADN de FABP5 humana, pcDNA3.1-hFABP5 (como se describe en Materiales y Métodos). Las células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 vacío se utilizaron como control y se denominaron "pcDNA". El modelo de sobre expresión mostró un aumento de los niveles de FABP5 del 50% respecto de la línea control (Figura 9).



**Figura 9:** A) Niveles de FABP5 en modelo de sobre expresión: Células A549 fueron transfectadas con pcDNA3.1-hFABP5 o con el plásmido vacío pcDNA3.1 y seleccionadas con geneticina. Los niveles de FABP5 se evaluaron mediante Western Blot. Se utilizó vinculina como control de carga. B) Cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en el modelo de sobre expresión expresadas como FABP5/vinculina en unidades arbitrarias (UA). Los resultados corresponden a un experimento representativo y se expresan como la media  $\pm$  SD.  $p < 0,05$  T-test.

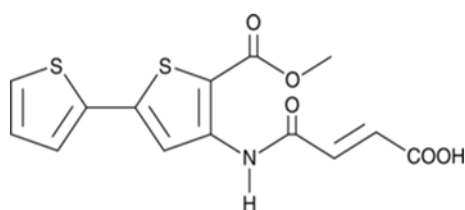
Asimismo, se generó un modelo *knockdown* de FABP5 mediante la transfección transitoria de células A549 con dos secuencias de siRNAs direccionadas hacia el RNA mensajero de FABP5, secuencias “siRNA8” y “siRNA10”. Un *pool* de siRNAs sin secuencias complementarias en el transcriptoma de mamíferos (NT: “*Non-targeting control pool*”) se usó como control. La concentración de los siRNAs y tiempo de transfección necesarios para reducir los niveles de la proteína fueron establecidos mediante Western Blot. Los niveles de FABP5 se redujeron con los siRNA 10 y 8 respecto del *pool* control, en las concentraciones ensayadas 2,5; 5 y 10 nM (Figura 10 A) a partir de las 48 hs post transfección (*resultados no mostrados*). Los ensayos subsiguientes se realizaron a las 48 hs post transfección, utilizando una concentración 10 nM de los siRNA y los niveles de FABP5 se redujeron un 30-70% respecto del control en distintos experimentos (Figura 10 B y C).

Como se describió previamente, diferentes estudios muestran que en respuesta a la disminución o eliminación de una FABP se produce un aumento de los niveles de otra isoforma [73, 188]. En el modelo *knockdown* de FABP5 en células A549 no se observó compensación con otras isoformas de FABPs (Figura 10 D).

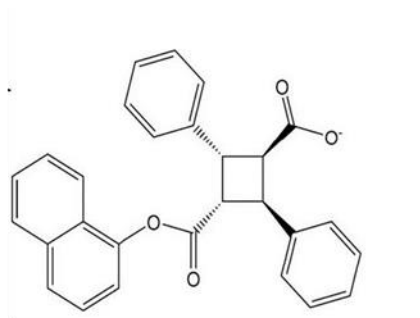


**Figura 10:** Modelo *knockdown* de FABP5 en células A549: A) Tres concentraciones (2,5; 5 y 10 nM) de los siRNA 8,10 y del *pool* de secuencias NT fueron ensayadas y los niveles de FABP5, 48 hs post transfección, se determinaron por Western Blot. Como control de carga en se utilizó  $\beta$ -Actina. B) Células A549 se transfectoron utilizando una concentración 10 nM de las secuencias de siRNA10 y 8 para silenciar FABP5 o un *pool* de secuencias NT como control. Se evaluaron los niveles de FABP5 y  $\beta$ -Actina a las 48 hs post transfección. C) Cuantificación densitométrica de la señal de FABP5 normalizada a  $\beta$ -Actina. D) Perfil de expresión de FABPs en el modelo *knockdown* de FABP5. Los controles positivos utilizados fueron: Homogenato de corazón (FABP3) y tejido adiposo (FABP4) de rata, FABP1, FABP2 y FABP7 recombinantes de rata purificadas). \*\* $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  ANOVA.

Los estudios realizados en los modelos con niveles alterados de FABP5 se complementaron utilizando compuestos químicos inhibidores de FABPs (Figura 11). HTS01037, es un inhibidor pan específico de FABPs [177], y SBF126, un inhibidor específico de FABP5 y FABP7 [178].



HTS01037



SBFI26

Figura 11: Estructuras moleculares de los compuestos inhibidores de FABPs.

## 2. Estudio de la función de FABP5 en el destino de los FA en células neoplásicas.

### 2 A. Lipogénesis

#### *FABP5 es necesaria para la incorporación de FA exógenos en lípidos celulares*

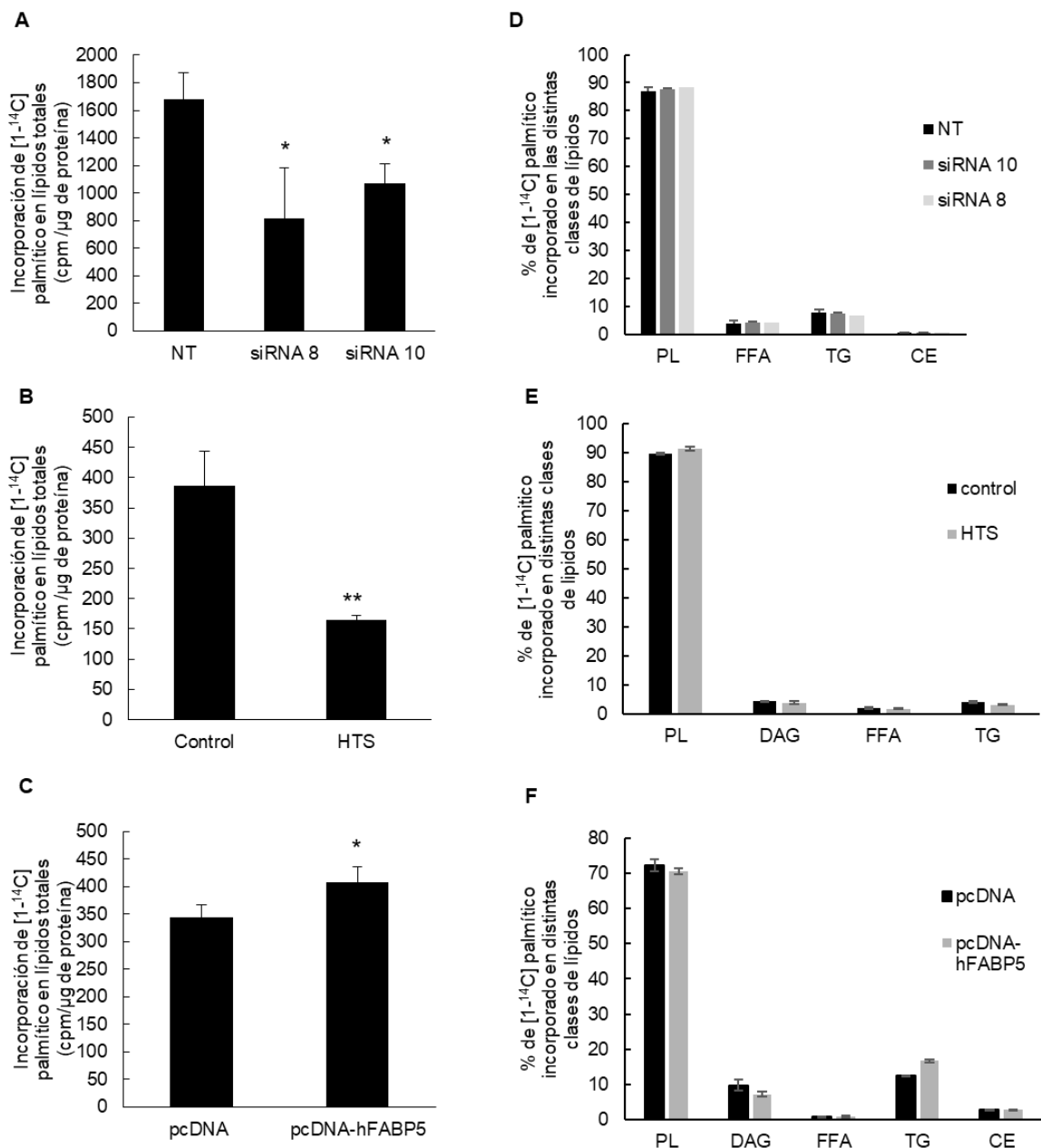
Las FABPs son proteínas pequeñas que presentan elevada afinidad por FA de cadena larga. Se ha propuesto que podrían transportar los FA a diferentes compartimentos celulares dirigiéndolos así hacia su oxidación, utilización en síntesis de lípidos complejos y regulación de factores transcripcionales [46]. En búsqueda de establecer la función de FABP5 en el metabolismo lipídico de células tumorales como transportadora de FA, se evaluó si participa de la incorporación de FA exógenos en lípidos complejos y si éstos son vehiculizados hacia la síntesis de una clase de lípido en particular.

Hipótesis: FABP5 es necesaria para la incorporación de FA exógenos en los lípidos celulares y los direcciona principalmente hacia la síntesis de fosfolípidos favoreciendo la activa producción de membranas en células tumorales.

La función de FABP5 en el direccionamiento de los FA hacia vías lipogénicas se estudió en las líneas celulares generadas con niveles alterados de FABP5 y en células A549 tratadas con el inhibidor químico HTS01037, mediante la incubación con ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico por 4 hs. Las células transfectadas con los siRNA contra FABP5 presentaron una reducción en la incorporación del ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico en lípidos totales del 40% respecto del control (Figura 12 A). Se observaron resultados similares en células incubadas por 24 hs con el inhibidor pan-específico de FABPs, HTS01037 (Figura 12

B). Contrariamente, la sobre expresión de FABP5 incrementó un 20% la incorporación de ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico en lípidos totales respecto del control (Figura 12 C). El ácido palmítico fue incorporado mayormente en fosfolípidos, sin embargo, no se alteró la distribución porcentual del FA radioactivo en las distintas clases de lípidos en ninguno de los modelos celulares (Figuras 12 D, E y F).

En conjunto los resultados sugieren que FABP5 es necesaria para la incorporación de FA exógenos en lípidos celulares. Sin embargo, no direcciona preferencialmente los FA exógenos hacia una vía lipogénica específica en células provenientes de LUAD.

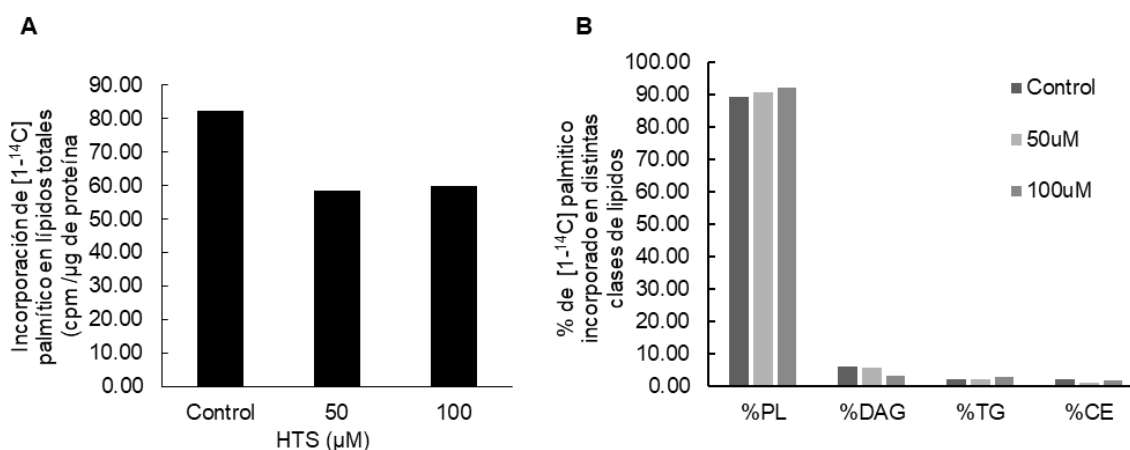




**Figura 12:** FABP5 participa en la incorporación de FA exógenos en lípidos sin direccionarlos hacia una vía lipogénica específica. A) Células A549 fueron transfectadas con los siRNA 8, 10 o NT, o B) incubadas por 24 hs con 100  $\mu\text{M}$  HTS01037, o C) células que sobre expresan FABP5 fueron incubadas con ácido  $[1-^{14}\text{C}]$  palmítico por 4 hs. Se extrajeron los lípidos y se cuantificó la radioactividad incorporada en lípidos totales normalizada al contenido de proteína. Los lípidos celulares extraídos del modelo *knockdown* de FABP5 (D), de células A549 tratadas con HTS01037 (E) y de células que sobre expresan FABP5 (F), fueron separados por cromatografía de capa fina (TLC) utilizando un sistema de solventes para lípidos neutros. Las bandas se rasparon y cuantificaron para determinar la distribución de la radioactividad incorporada en las distintas clases de lípidos. (PL: fosfolípidos, DAG: diacilglicéridos, FFA: ácidos grasos libres, TG: triacilglicéridos, CE: ésteres de colesterol). \*\* $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . t-test y ANOVA.

Estos resultados se replicaron en la línea celular MDA-MB-231, proveniente de un cáncer de mama, para el cual la importancia de FABP5 en el fenotipo neoplásico ha sido ampliamente documentada [156, 157, 170]. Al igual que en las células A549, la incorporación de ácido  $[1-^{14}\text{C}]$  palmítico disminuyó un 25% en células MDA-MB231 tratadas con el inhibidor de FABPs (HTS01037) (Figura 13 A). Adicionalmente, no se observaron diferencias en la distribución de la marca radioactiva en las distintas clases de lípidos (Figura 13 B).

Los resultados obtenidos en células provenientes de LUAD y en la línea celular MDA-MB231, sugieren que FABP5 es necesaria para la incorporación de FA exógenos en lípidos celulares.



**Figura 13:** FABP5 es necesaria para la incorporación de FA exógenos en lípidos celulares en células provenientes de cáncer de mama triple negativo. A) Células MDA-MB-231 tratadas con HTS01037 50  $\mu\text{M}$  o 100  $\mu\text{M}$  por 24 hs, se incubaron con ácido  $[1-^{14}\text{C}]$  palmítico por 4 hs. Los lípidos fueron extraídos (como se indica en Materiales y Métodos) y la marca radioactiva se cuantificó por contador de centelleo líquido. B) Mediante TLC se separaron los lípidos y las bandas obtenidas se rasparon y cuantificaron. Los valores representados corresponden a la media de duplicados.

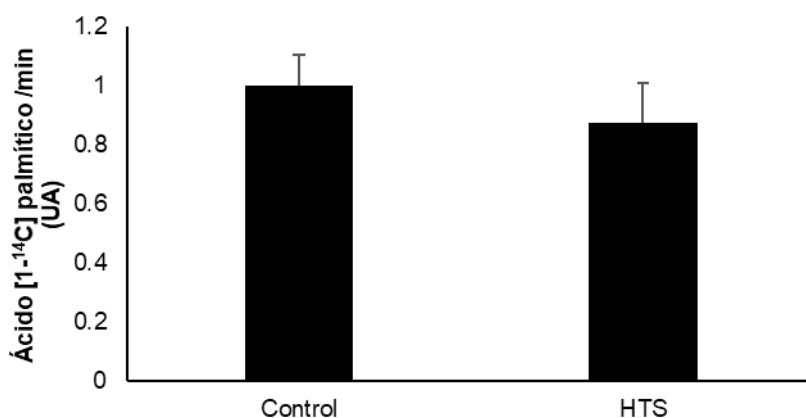
### *La captación de FA exógenos no se ve afectada por FABP5*

Existe evidencia sobre la participación de diferentes isoformas de FABPs en la captación de FA exógenos [57, 58, 60]. En particular, se ha observado en modelos de células endoteliales de cerebro que FABP5 es necesaria para la internalización de FA [178, 189]. En adipocitos de ratones, sin embargo, la sobre expresión de la proteína no afecta el *uptake* de FA [75]. Adicionalmente un estudio reciente revela que CD36, una glicoproteína que participa de la captación de FA, y FABP5 se encuentran coordinadamente reguladas en NSCLC [190]. Se evaluó si FABP5 se encuentra involucrada en la captación de FA en células de LUAD.

Hipótesis: FABP5 favorece la internalización de FA exógenos en células A549.

Analizamos los niveles de CD36 mediante Western Blot. Adicionalmente, se estudió la captación de FA en células A549 tratadas con el inhibidor HTS01037 100  $\mu$ M o DMSO (vehículo) mediante la incubación con ácido [1- $^{14}$ C] palmítico por un minuto. La proteína CD36 no fue detectada en las condiciones ensayadas. Notablemente, tratamiento con el inhibidor de FABPs no modificó la capacidad de internalizar ácido [1- $^{14}$ C] palmítico al tiempo ensayado (Figura 14).

Estos resultados sugieren que FABP5 no es necesaria para la captación de FA exógenos en células tumorales de LUAD.



**Figura 14:** La captación de FA exógenos no se ve afectada por FABP5: Células A549 fueron tratadas con HTS01037 en una concentración 100  $\mu$ M o con vehículo (DMSO) como control durante 24 hs. La radioactividad presente en las células luego de una incubación de 1 minuto con ácido [1- $^{14}$ C] palmítico complejoado con BSA fue cuantificada. Los resultados corresponden a la media  $\pm$ SD (n=6). T-test.

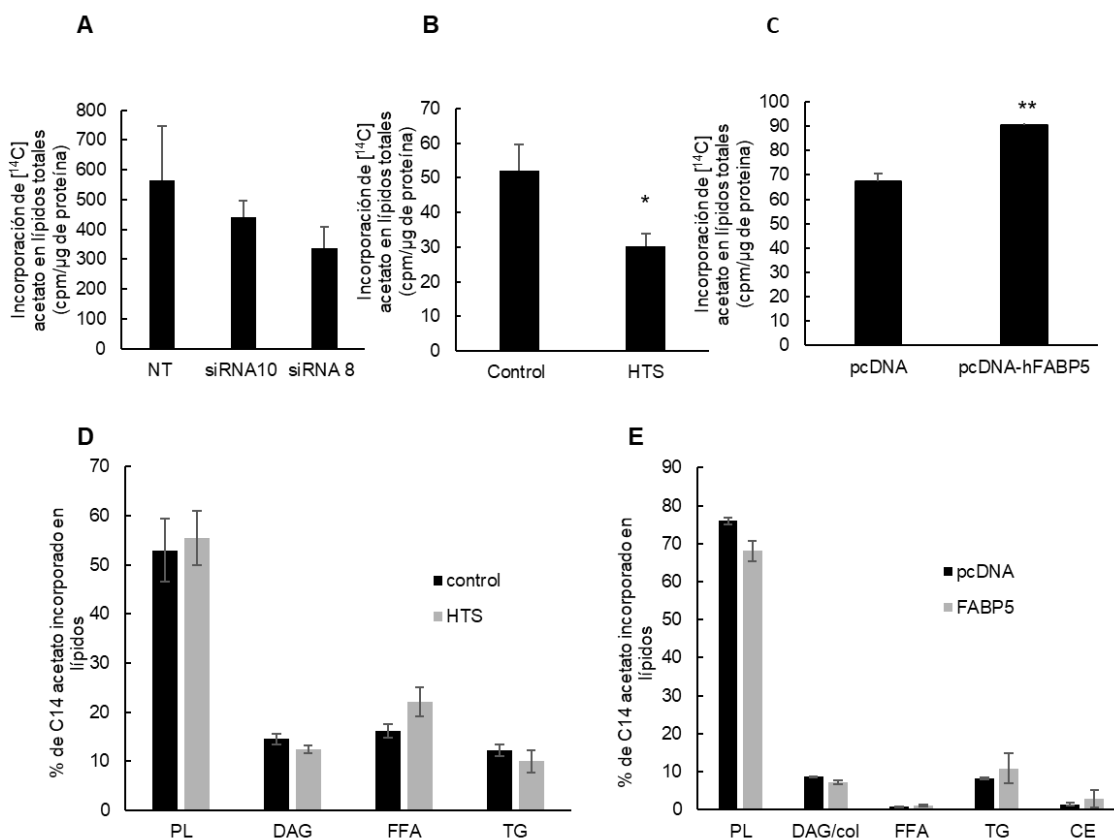
### *FABP5 es necesaria para la síntesis endógena de FA*

A diferencia de lo que ocurre en células normales, la síntesis *de novo* de FA se encuentra incrementada en células tumorales probablemente para generar los FA requeridos en la síntesis de lípidos de membrana. La importancia de la síntesis *de novo* en la proliferación y su posible uso terapéutico en distintos tipos de cáncer han sido demostrados [121, 124-126, 139]. Recientemente FABP5 se ha relacionado con esta vía [64, 175, 191] pero no se ha determinado si la síntesis *de novo* se encuentra efectivamente modificada por FABP5. Investigamos en células de LUAD si FABP5 modula la síntesis *de novo* de FA.

Hipótesis: el efecto promotor tumoral de FABP5 se debe a la activación de la síntesis endógena de FA para la producción de lípidos de membranas.

Utilizando los modelos celulares generados con niveles alterados de FABP5 y un inhibidor químico, HTS01037, realizamos ensayos de incorporación de [<sup>14</sup>C] acetato. Las células tratadas con el inhibidor de FABPs o con siRNAs contra FABP5 mostraron una reducción en la incorporación de [<sup>14</sup>C] acetato en los lípidos celulares (Figura 15 A y B). El efecto del *knockdown* fue menos pronunciado, probablemente por la reducción parcial en el nivel de FABP5. De forma opuesta, la sobre expresión de FABP5 incrementó significativamente la incorporación de [<sup>14</sup>C] acetato en un 35 % en lípidos celulares (Figura 15 C). Al analizar en qué clases de lípidos complejos fue incorporado el [<sup>14</sup>C] acetato, se observó una mayor proporción en fosfolípidos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la distribución relativa de la marca radioactiva al alterar los niveles de FABP5, ni al incubar las células con HTS01037 (Fig. 15 D y E). Las diferencias en la radioactividad incorporada en lípidos se deben a la síntesis *de novo* de FA, dado que la incorporación [<sup>14</sup>C] acetato en lípidos insaponificables no se encontró modificada respecto del control al aumentar los niveles de FABP5 (*resultados no mostrados*).

En conjunto, los resultados indican que FABP5 es necesaria para la síntesis endógena de FA y su incorporación en lípidos celulares.



**Figura 15:** FABP5 regula la síntesis *de novo* de FA. Células A549 transfectadas con siRNA 8, 10 o NT por 48 hs (A), tratadas con HTS01037 100  $\mu\text{M}$  o vehículo (DMSO) por 24 hs (B) o que sobre expresan FABP5 (C), fueron incubadas por 4 hs con  $[^{14}\text{C}]$  acetato previo a su cosechado. Los lípidos celulares se extrajeron como lo describieron Bligh & Dyer y la radioactividad asociada a los mismos se cuantificó en un contador de centelleo líquido. Parte de los lípidos extraídos de células tratadas con el inhibidor HTS01037 (D) o que sobre expresan FABP5 (E) se resolvieron por TLC utilizando sistema de solventes para lípidos neutros y las bandas obtenidas se rasparon y cuantificaron por centelleo líquido. (PL: fosfolípidos, DAG: diacilglicéridos, FFA: ácidos grasos libres, TG: triacilglicéridos, CE: ésteres de colesterol). Los valores corresponden a la media  $\pm$  SD de un experimento representativo ( $n = 3$ ). \*\* $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . t-test y ANOVA.

### *La inhibición de FABP5 reduce la secreción de lípidos componentes del surfactante pulmonar*

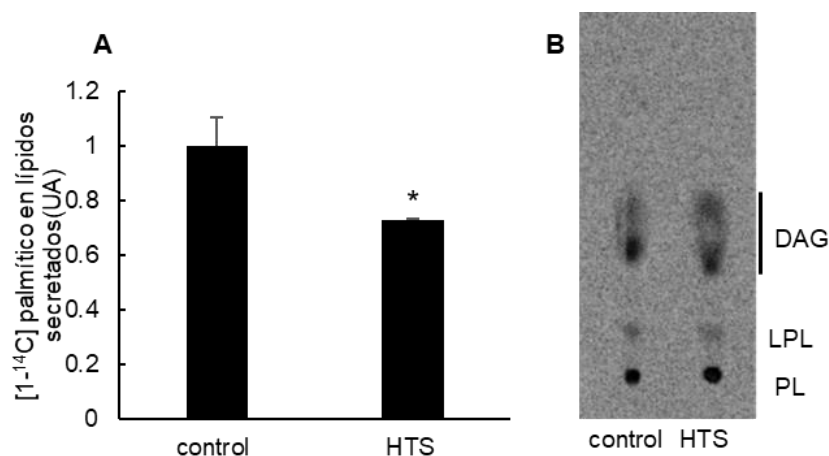
La línea celular A549 presenta características de células alveolares tipo II, como la capacidad de secretar surfactante pulmonar [192, 193]. FABP5 se expresa en células alveolares tipo II [194] y se ha reportado que ratones doble *knockout* para FABP3 y FABP5 muestran alteraciones en la síntesis de surfactante pulmonar [77]. La fracción lipídica del surfactante pulmonar se constituye principalmente de fosfolípidos y un pequeño porcentaje de lípidos neutros [195-198], siendo la dipalmitoilfosfatidilcolina el componente mayoritario de los fosfolípidos [199]. Dada la participación de FABP5 en la

incorporación de FA a los lípidos celulares, se evaluó si esta proteína afecta la producción de los componentes lipídicos del surfactante en células A549.

Hipótesis: FABP5 participa del direccionamiento de FA hacia la producción de fosfolípidos que forman parte del surfactante pulmonar y son secretados por las células A549.

En los modelos celulares con niveles alterados de FABP5 realizamos un ensayo de pulso y caza, como se describe en Métodos. Se observó una disminución del 30% en la radioactividad asociada a los lípidos secretados en las células tratadas con el inhibidor de FABPs (Figura 16 A). La distribución relativa de los lípidos secretados marcados, compuestos principalmente por fosfolípidos, diacilglicéridos y lisofosfolípidos (Figura 16 B) no cambió significativamente entre los grupos.

Estos resultados sugieren que la inhibición de FABP5 reduce la secreción de lípidos componentes del surfactante pulmonar en células A549.



**Figura 16:** La inhibición de FABP5 reduce la secreción de surfactante pulmonar. Células A549 se incubaron con ácido [1-<sup>14</sup>C] palmítico por 24 hs, se lavaron, y se suplementaron con medio fresco en presencia o ausencia de 100  $\mu$ M HTS01037 o DMSO (vehículo) por 24 hs. Se extrajeron los lípidos del medio condicionado y se cuantificó la radioactividad (A). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) respecto del control. Los valores corresponden a la media  $\pm$ SD (n=3) \* p<0,05. t-test. (B) La distribución de la marca en los lípidos secretados, se estimó por cromatografía en capa fina.

## 2 B. Oxidación de combustibles metabólicos

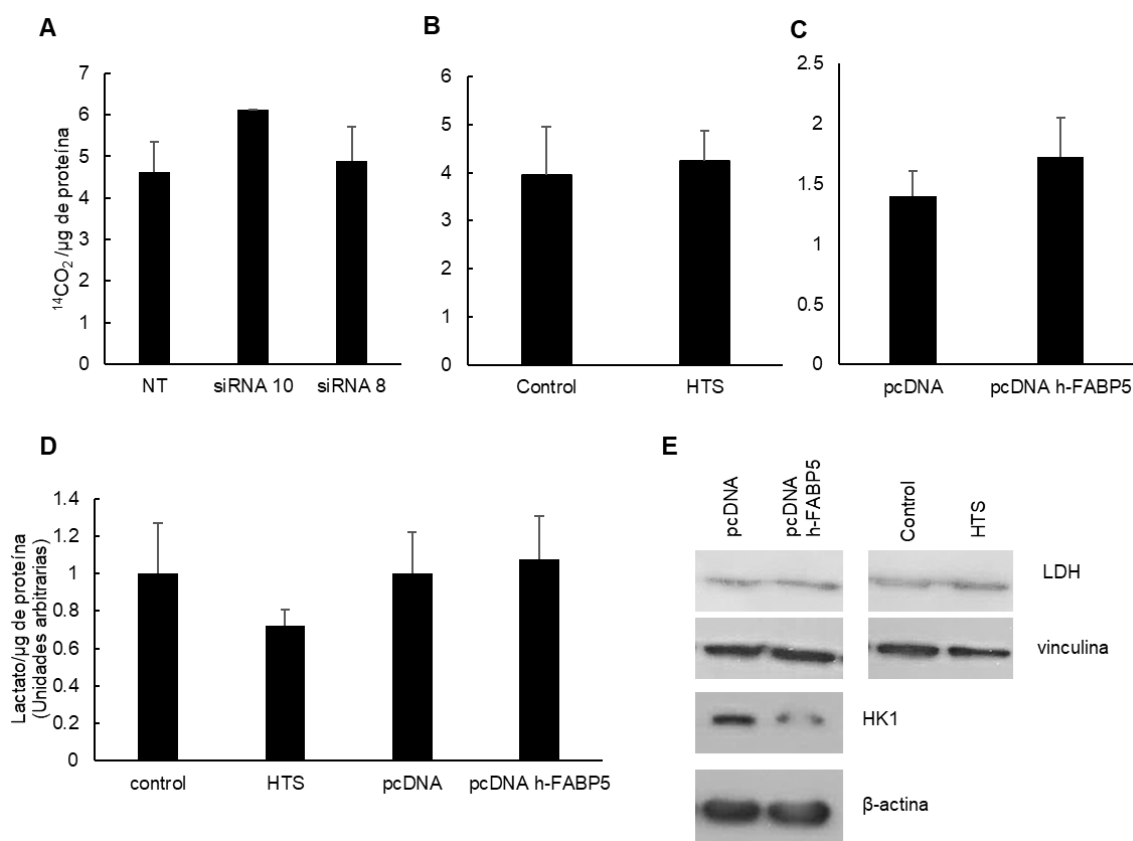
### *FABP5 no modifica el metabolismo energético celular*

Como se ha mencionado, los FA también pueden ser utilizados como fuente de energía mediante su oxidación en la mitocondria. Se desconoce si FABP5 promueve la utilización de los FA como fuente de energía en células tumorales produciendo alteraciones en el metabolismo energético celular.

Hipótesis: FABP5 transporta los FA hacia vías de síntesis de lípidos, desviándolos de vías catabólicas como la  $\beta$ -oxidación. Asimismo, FABP5 favorece la producción de energía mediante “glucólisis aeróbica” la cual aporta, además, sustratos necesarios para procesos anabólicos, como la síntesis de FA.

Cuantificamos el  $^{14}\text{CO}_2$  producido a partir de ácido [1- $^{14}\text{C}$ ] palmítico para estimar la oxidación de FA en las células A549 con niveles alterados de FABP5. Adicionalmente, se analizó la relación entre FABP5 y la “glucólisis aeróbica” a través de la cuantificación del lactato secretado al medio y la determinación de los niveles de las enzimas lactato deshidrogenasa y hexoquinasa 1. Como se observa en la Figura 17, los niveles de  $^{14}\text{CO}_2$  no presentaron diferencias significativas al disminuir los niveles de FABP5 (A) o al inhibir la proteína (B), ni en el modelo de sobre expresión (C) respecto de los controles correspondientes. Aunque se ve una disminución de la expresión de hexoquinasa 1 en las células que expresan niveles elevados de FABP5, no se encontraron diferencias en los niveles de lactato producidos, ni de la enzima lactato deshidrogenasa al aumentar la expresión de FABP5, como tampoco al tratar las células con HTS01037.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que FABP5 no modifica el metabolismo energético celular a través de la oxidación de FA o de la glucólisis en células tumorales provenientes de LUAD.



**Figura 17:** FABP5 no modifica el metabolismo energético celular. Células A549 transfectadas con los siRNA 8 y 10, o con el pool NT(A), tratadas por 24 hs con HTS01037 o con el vehículo (DMSO) (B), y células A549 que sobre expresan FABP5 se incubaron por 4hs con  $[1-^{14}\text{C}]$  palmítico. El  $^{14}\text{CO}_2$  liberado se cuantificó en un contador de centelleo líquido. En todos los casos, la radioactividad asociada al  $\text{CO}_2$  se normalizó por la cantidad de proteína total en cada muestra. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SD de un experimento representativo ( $n>4$ ) t-test y ANOVA. D) Los niveles de lactato se cuantificaron utilizando un kit colorimétrico en la línea celular A549 pcDNA y A549 pcDNA-hFABP5, como así también en células A549 tratadas con el inhibidor HTS01037 100  $\mu\text{M}$  o con DMSO (vehículo) por 24hs. E) Los niveles de LDH (lactato deshidrogenasa) determinados por Western Blot en células A549 tratadas con HTS01037 por 24hs y en células con niveles aumentados de FABP5 (pcDNA-hFABP5). El nivel de la hexoquinasa 1 (HK1) se estudió en el modelo celular de sobre expresión de FABP5. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SD de un experimento representativo ( $n=4$ ) ANOVA.

*El contenido total y el perfil de FA no se ven afectados por los niveles de FABP5*

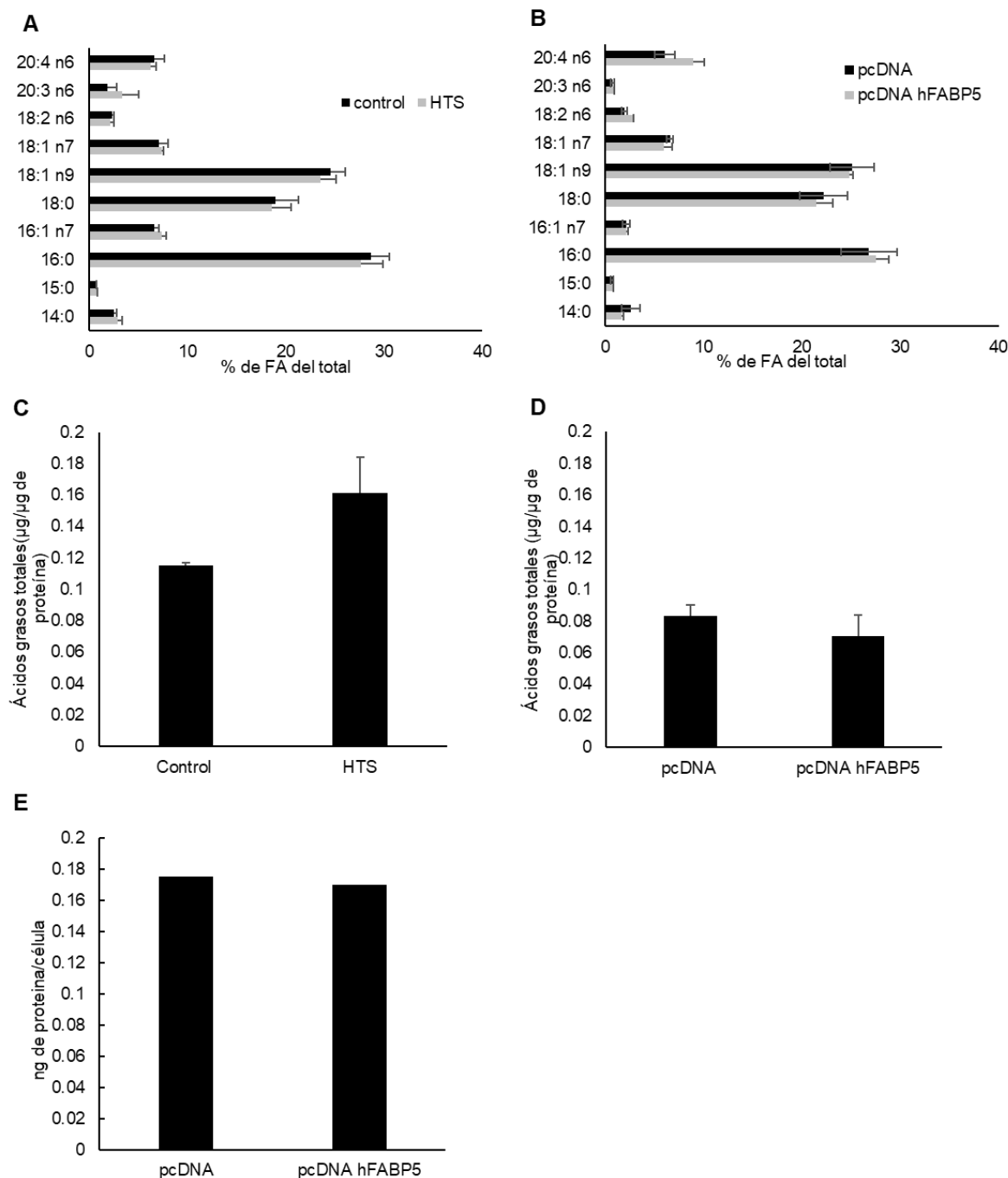
Dadas las diferencias observadas en la síntesis *de novo* de FA sin alteraciones en la degradación de los mismos, estudiamos si FABP5 altera el contenido y la composición de los FA en las células A549.

Hipótesis: Alteraciones en los niveles de FABP5 producen cambios en el contenido y la composición de FA en las células A549.

Se extrajeron los lípidos de células con niveles elevados de FABP5, células A549 tratadas con HTS01037 y de los controles correspondientes. Mediante cromatografía gaseosa se analizó el perfil de FA y se determinó la identidad mediante la comparación con estándares comerciales de FA. Para la cuantificación de FA totales se adicionó ácido heptanoico (17:0) como estándar interno. Contrariamente a lo esperado, no se observaron cambios en las proporciones de FA saturados e insaturados al inhibir FABP5 ni al aumentar sus niveles (Figura 18 A y B). Más aún, no hubo diferencias significativas en la cantidad total de FA normalizada al contenido de proteínas en los modelos celulares (Figura 18 C y D), ni en la cantidad de proteína por célula en el modelo de sobre expresión (Figura 18 E), sugiriendo que no hay cambios en el contenido de FA por célula.

Los resultados indican que las células tumorales de LUAD mantienen el contenido y la composición de FA independientemente de FABP5 y las modificaciones en el metabolismo de FA que produce.





**Figura 18:** El perfil y el contenido de FA no se modifica por FABP5: A y B: Se extrajeron los lípidos de células A549 tratadas con el inhibidor de FABPs HTS01037 y de la línea celular que sobre expresa FABP5 respectivamente. Mediante cromatografía gas líquida se analizó el perfil de FA. La identidad de los distintos FA se determinó utilizando una mezcla de FA comercial. C y D) Se agregó ácido heptanoico (estándar interno) a los lípidos extraídos de células A549 tratadas con HTS01037 100 µM o el vehículo (DMSO) y a las células con niveles de FABP5 aumentados. Los ésteres metílicos derivados de FA fueron analizados por cromatografía y la cantidad total fue estimada respecto del ácido heptanoico. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=3) de un experimento representativo. T-test o ANOVA. E) Se realizó el recuento de células en cámara de Neubauer y la cuantificación de proteínas por el método de Bradford de células A549 pcDNA y A549 pcDNA-hFABP5. Los resultados se expresan como proteína/célula. Los valores corresponden a la media (n=2).

## 2 C. Regulación de la expresión génica

Los FA regulan la expresión génica mediante la unión a receptores nucleares como los PPARs [39]. FABP5 en particular, ha sido asociada a la activación de PPAR $\beta/\delta$  por ácido retinoico o ligandos sintéticos en diversos cánceres [167, 170, 200]. En LUAD no hay evidencias de que FABP5 participe en la regulación de la transcripción. Investigamos si FABP5 modifica la expresión de proteínas en LUAD y si regula el metabolismo de lípidos mediante la activación de PPARs.

Hipótesis. FABP5 regula la expresión génica en LUAD.

Inicialmente se evaluó el perfil de expresión génica asociado a FABP5 en muestras de tumores de LUAD. Para ello, se realizó un análisis bioinformático a partir de un set de datos de expresión del TCGA, dividiendo a los tumores en dos grupos, por la mediana, en alta y baja expresión de FABP5. Los genes diferencialmente expresados entre ambos grupos y las muestras, se sometieron a un análisis jerárquico no supervisado obteniéndose dos *clusters* de muestras y dos de genes. Se realizó el enriquecimiento funcional del *cluster* correspondiente a los genes cuyos niveles se modifican directamente con los de FABP5 (naranja) o bien aquellos genes que se ven inversamente relacionados al nivel de FABP5 (turquesa). Los resultados mostraron que las vías biológicas cuyos genes se encontraron asociados a los niveles de FABP5 en tumores, corresponden en su mayoría a procesos inmunes (Figura 19 A). Estos resultados podrían estar sesgados diferencialmente por la presencia de células pertenecientes al sistema inmune, que expresan FABP5, en las muestras utilizadas para el análisis. A fin de independizarnos de la infiltración inmune tumoral, se evaluaron los genes diferencialmente expresados en líneas celulares derivadas de LUAD en función de los niveles de expresión de FABP5. Los resultados del enriquecimiento funcional sugieren que FABP5 regula la expresión génica afectando el ciclo celular y la transcripción génica (Figura 19 B y C).

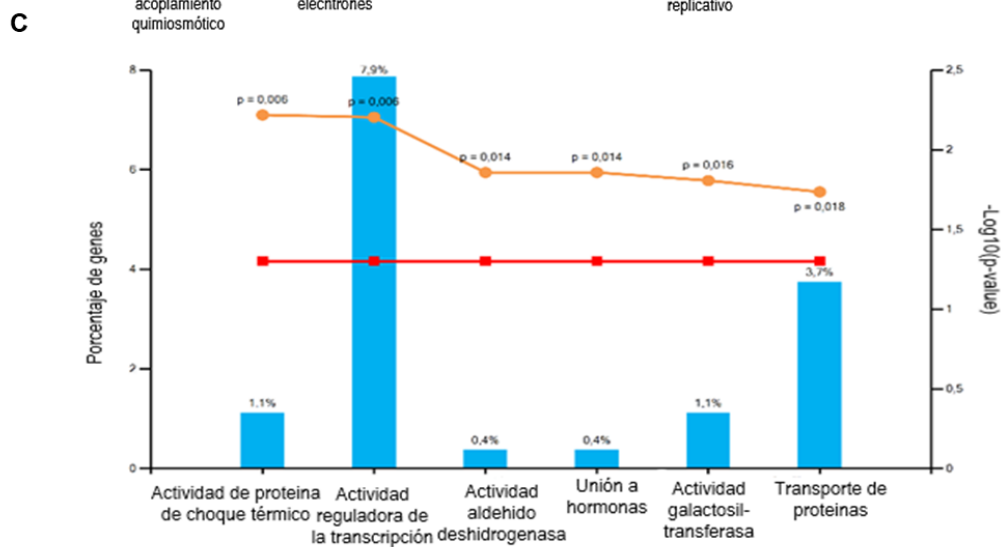
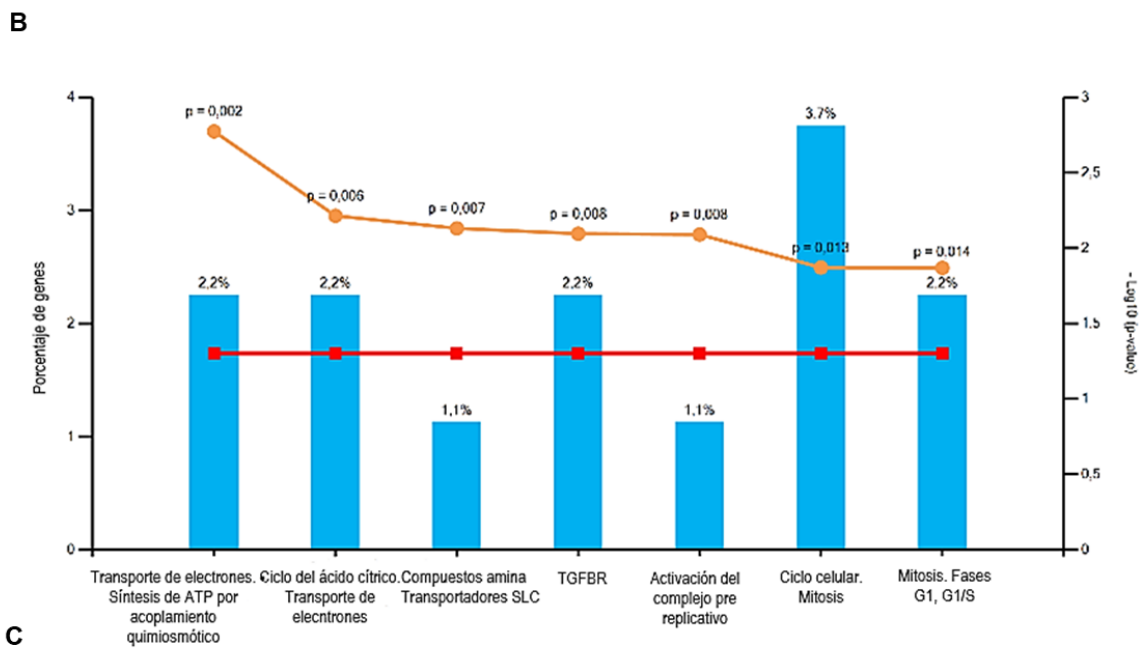
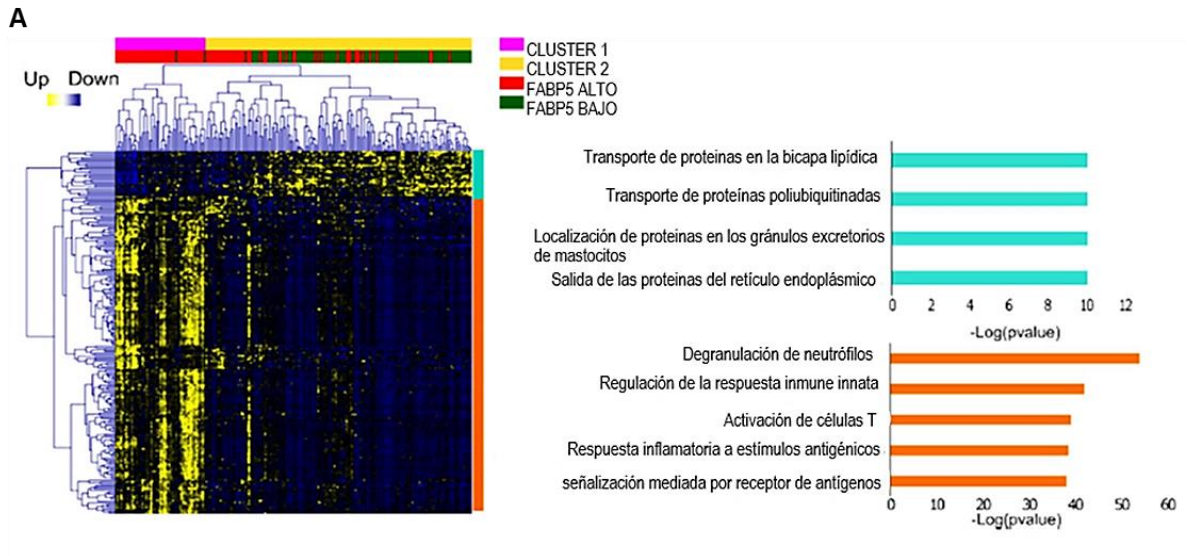
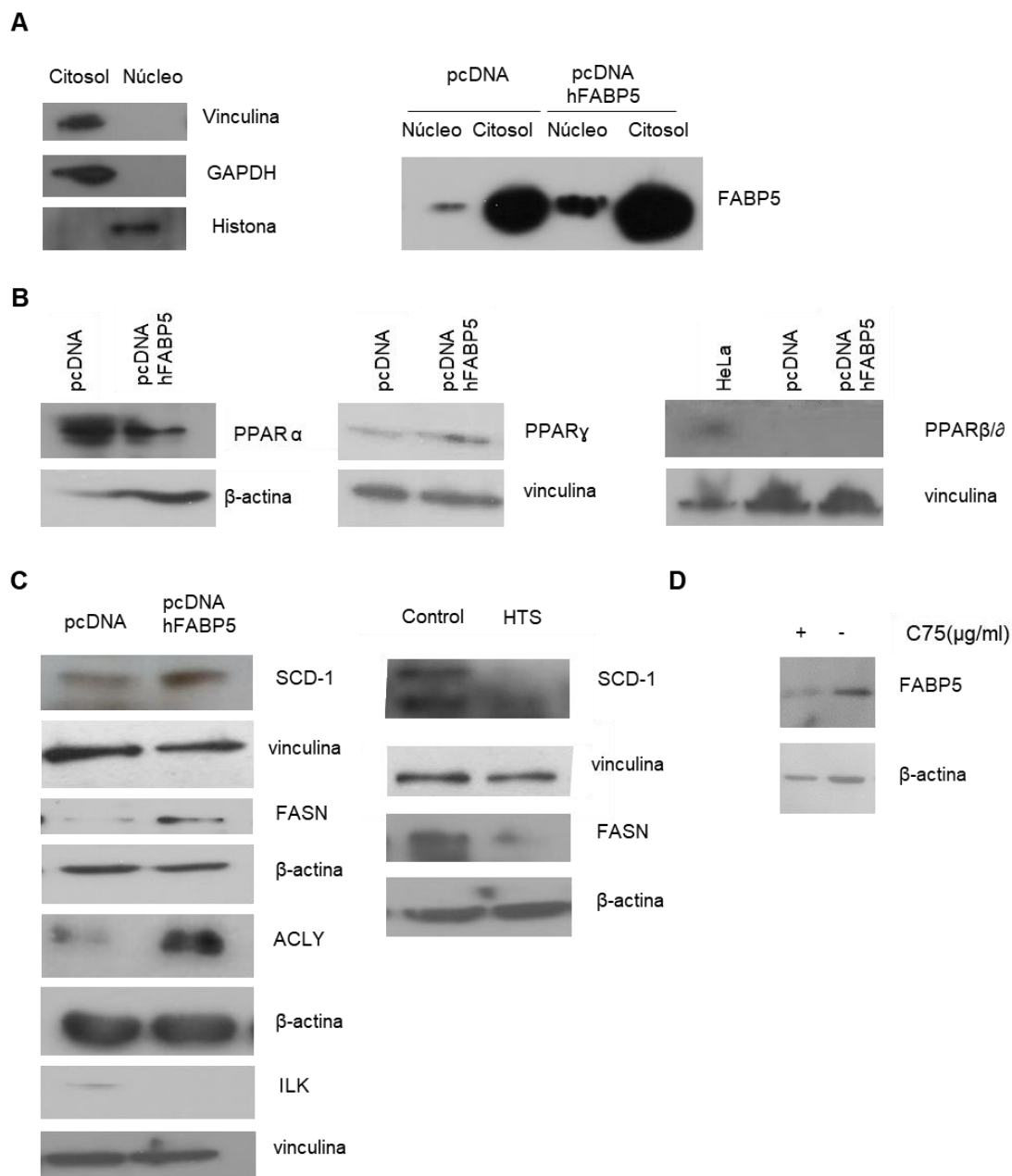


Figura 19: (página previa) FABP5 regula la expresión génica en LUAD. A) Genes diferencialmente expresados en tumores de LUAD (TCGA) separados por la mediana en dos grupos, alta y baja expresión de FABP5 p-valor<0,0001. En el panel derecho se grafica el enriquecimiento funcional de cada cluster de genes. B y C) Análisis del enriquecimiento funcional de genes diferencialmente expresados en células de LUAD (CCLE) según vías biológicas y funciones moleculares respectivamente. Gráfico de barras que representa el porcentaje de genes afectados por los niveles de FABP5. p-valor=0,05: línea roja,  $-\log_{10}$  (p-valor): línea naranja.

A continuación, se analizó si FABP5 transloca a núcleo en nuestras condiciones experimentales. Los niveles en el núcleo como en el citosol se evaluaron mediante fraccionamiento celular (como se describe en materiales y métodos) y Western Blot en la línea A549 que sobre expresa FABP5 y su control. La pureza de las fracciones se determinó utilizando vinculina y GAPDH (marcadores de citosol) e Histona H1 (marcador de núcleo) (Figura 20 A, panel izquierdo). FABP5 se encontró en el núcleo de células A549 y en la fracción citosólica en ambos modelos (Figura 20 A, panel derecho).

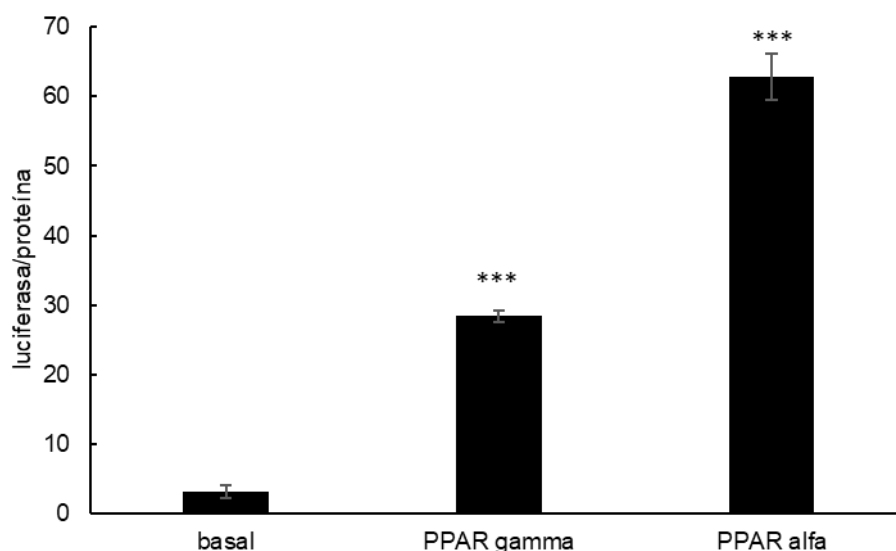
Con el objetivo de determinar si la presencia de FABP5 en el núcleo está relacionada con la activación de PPARs y la regulación de la expresión de enzimas que participan del metabolismo de lípidos, se estimaron mediante Western Blot, los niveles de expresión de isoformas de PPARs ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ), ILK (quinasa unida a integrinas), SCD-1 (estearoil-CoA desaturasa 1), FASN (Ácido Graso Sintasa) y ACLY (ATP citrato liasa). En el perfil de expresión de PPARs se detectaron las isoformas  $\alpha$  y  $\gamma$ ; sin embargo, PPAR  $\beta/\delta$ , la isoforma principalmente asociada a FABP5, no se encontró en la línea celular A549 (Figura 20 B). Además, se observó una reducción de ILK, gen blanco de PPAR  $\beta/\delta$ , en células que sobre expresan FABP5 (Figura 20 C). Notablemente, los niveles de proteínas lipogénicas (FASN, SCD-1 y ACLY) mostraron una relación directa con los niveles de FABP5 (Figura 20 C). Más aún, la inhibición de FASN con C75, redujo los niveles de FABP5 (Figura 20 D), apoyando la idea de una regulación recíprocamente coordinada entre FABP5 y la vía de síntesis *de novo* de FA.



**Figura 20:** FABP5 regula la expresión génica en células A549: A) Análisis de la pureza de las fracciones subcelulares utilizando vinculina y GAPDH (marcadores de citosol) e histona H1 (marcador de núcleo) en células A549 (panel izquierdo) y presencia de FABP5 en dichos compartimentos (panel derecho). B) Perfil de expresión de PPARs en células A549. C) Los niveles de SCD-1, FASN, ACLY e ILK se ensayaron por Western Blot utilizando lisados de células que sobre expresan FABP5 y su control (pcDNA) (Panel izquierdo). FASN y SCD-1 se evaluaron en homogenatos de células tratadas con HTS01037 o DMSO (vehículo) (Panel derecho). D) Células A549 se trataron con C75 (20  $\mu\text{g}/\text{ul}$ ) y se examinaron los niveles de expresión de FABP5 por Western Blot. Se utilizó vinculina y  $\beta$ -actina como control de carga. Las imágenes corresponden a un ensayo representativo.

Para evaluar directamente si FABP5 activa la transcripción génica en la línea celular A549 mediante PPARs, utilizamos un sistema reportero que consiste en la secuencia

PPRE río arriba del gen de luciferasa. Como PPAR $\beta/\delta$  no fue detectado en la línea celular A549, estudiamos si FABP5 activa la transcripción génica a través de las isoformas de PPAR que se expresan en nuestro modelo ( $\alpha$  y  $\gamma$ ). Para poner a punto la técnica en un modelo fácilmente transfectable se utilizó la línea celular HeLa que expresa sólo FABP5. Se realizó la transfección utilizando los plásmidos pGL4-PPRE-Luc y pcDNA3.1-mPPAR $\gamma$  o pCMX-mPPAR $\alpha$ . Como se esperaba, el aumento de la expresión de las isoformas alfa y gamma de PPARs individualmente, incrementaron la señal de luciferasa respecto de las condiciones basales (Figura 21). Se llevaron a cabo numerosos ensayos utilizando distintos métodos de transfección transitoria (con diferentes lipofectaminas, electroporación y polietilenimina) en la línea celular A549. Lamentablemente, a diferencia de lo que se observa en las células HeLa, las células A549 no presentaron una eficiencia de transfección adecuada para el ensayo de gen reportero.



**Figura 21:** Ensayo reportero de luciferasa en células HeLa transfectadas con los plásmidos pGL4-PPRE-Luc y pcDNA3.1-mPPAR $\gamma$  o pCMX-mPPAR $\alpha$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=3) de un experimento representativo. \*\*\*p<0,001 \*\*p< 0,01, \*p<0,05 ANOVA.

En conjunto, los resultados sugieren que FABP5 regula la expresión génica en células provenientes de LUAD, por un mecanismo distinto de PPAR  $\beta/\delta$ , alterando la expresión de enzimas que participan del metabolismo de FA. Lamentablemente, no pudimos evaluar la participación de PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  en nuestro modelo.

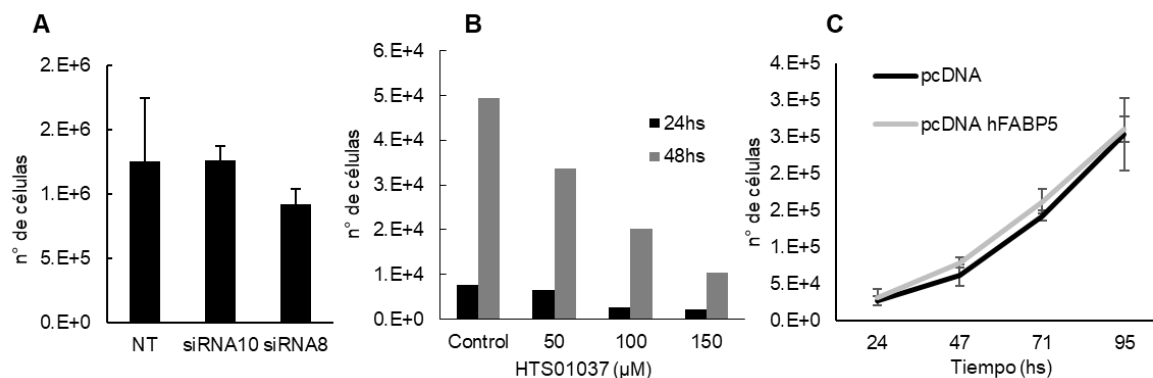
### 3. Analizar el papel de FABP5 en el fenotipo celular neoplásico

FABP5 promueve la proliferación, migración e invasión de células tumorales y favorece el crecimiento de tumores [152-157, 163, 166, 167, 170, 185-187]. Nuestro análisis bioinformático indica que niveles elevados de FABP5 en LUAD se asocian con un peor pronóstico (Figura 1B). Adicionalmente, en células derivadas de LUAD, FABP5 regula positivamente la síntesis *de novo* de FA (Figura 10), vía indispensable para mantener el fenotipo tumoral y promover el desarrollo de tumores [124, 127, 201]. Evaluamos si FABP5 promueve el fenotipo neoplásico de células derivadas de LUAD.

Hipótesis: FABP5 es necesaria para la proliferación, migración, adhesión celular y el desarrollo de tumores en un modelo *in vivo*, en células provenientes de LUAD.

#### *FABP5 es necesaria para la proliferación celular*

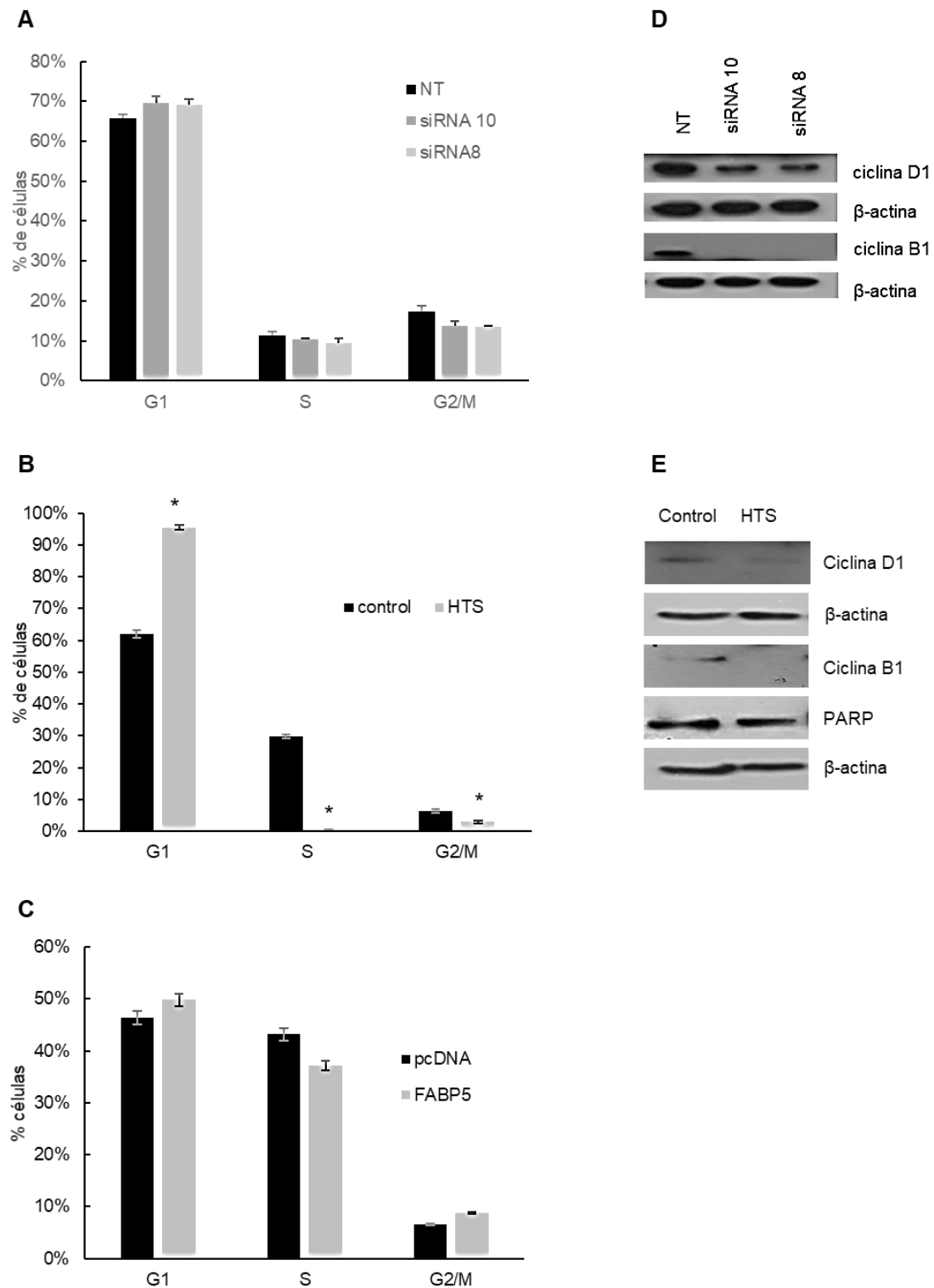
La proliferación en los modelos celulares con niveles alterados de FABP5 se estudió mediante el recuento y la viabilidad celular que se evaluaron en cámara de Neubauer utilizando la tinción con azul de tripán. En el modelo *knockdown* de FABP5 se observó una tendencia a la disminución del número de células a las 48 hs post transfección, sin que llegara a ser estadísticamente significativa (Figura 22 A). El tratamiento con HTS01037 redujo la proliferación celular de forma dosis dependiente a las 24 y a las 48 hs (Figura 22 B). Concentraciones menores a 50  $\mu$ M del inhibidor no tuvieron efecto sobre el crecimiento celular (*resultados no mostrados*). Por último, no se observaron diferencias en las curvas de crecimiento de células que sobre expresan FABP5 respecto del control (Figura 22 C).



**Figura 22:** Células de LUAD requieren de FABP5 para la proliferación celular. A) Número de células luego de 48hs de silenciamiento de FABP5. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SD de un experimento representativo (n=3). B) Células A549 se incubaron por 24 hs y 48 hs con diferentes concentraciones de HTS01037 y se realizó el recuento celular con cámara de Neubauer. Los valores corresponden a la media de duplicados. C) Curva de crecimiento de células A549 transfectadas con pcDNA3.1 hFABP5 y con pcDNA3.1 vacío. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SD de un experimento representativo (n=3).

A fin de caracterizar el efecto de FABP5 en la proliferación celular se ensayaron los niveles de PARP clivado, como indicador de apoptosis y de las ciclinas D1 y B1, cuyos niveles se encuentran aumentados en las fases G1 y G2/M del ciclo celular, respectivamente. Adicionalmente, se analizó la distribución de las células en el ciclo celular mediante citometría de flujo, utilizando bromodeoxiuridina (BrdU) y tinción con yoduro de propidio, como se describe en Métodos. Las células tratadas con HTS01037 presentaron niveles de ciclina B1 y ciclina D1 reducidos sin observarse PARP clivado, indicando que los cambios en la proliferación pueden asociarse al arresto celular en fase G0/G1 temprana (Figura 23 E). Además, el análisis del ciclo celular por citometría de flujo reveló un incremento de células en fase G0/G1 con una disminución en el porcentaje de células en G2/M y una notable reducción del porcentaje de células en fase S al ser tratadas con HTS01037, respecto de las células control (Figura 23 B). El modelo *knockdown* para FABP5 también muestra una reducción de ciclinas D1 y B1, y aunque no presentó diferencias significativas en la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular, las tendencias acompañan los resultados obtenidos con el inhibidor de FABPs (Figura 23 A y D). En células que sobre expresan FABP5 no se observaron alteraciones en la distribución en el ciclo celular respecto del control (Figura 23 C).

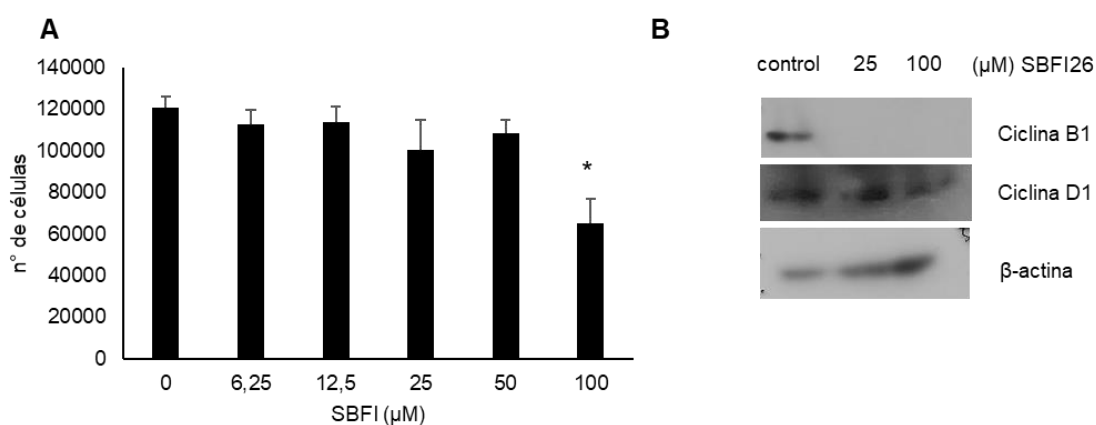




**Figura 23:** La inhibición de FABP5 produce arresto del ciclo celular. Células A549 transfectadas con los siRNA10 y 8 direccionados al mRNA de FABP5 o con el pool control NT (A), tratadas con HTS01037 o con DMSO (control) por 24 hs (B) y células que sobre expresan FABP5 (C) se trataron por 2 hs con BrdU, se fijaron y se incubaron con anticuerpo anti-BrdU conjugado con FITC. Finalmente se tiñeron con ioduro de propidio. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se analizó por citometría de flujo. D y E) Niveles de ciclina B1, ciclina D1 y PARP evaluados mediante Western Blot en el modelo *knockdown* y en

células tratadas con el inhibidor de FABPs respectivamente. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SD de un experimento representativo ( $n = 3$ ) \*  $p < 0,05$ . ANOVA.

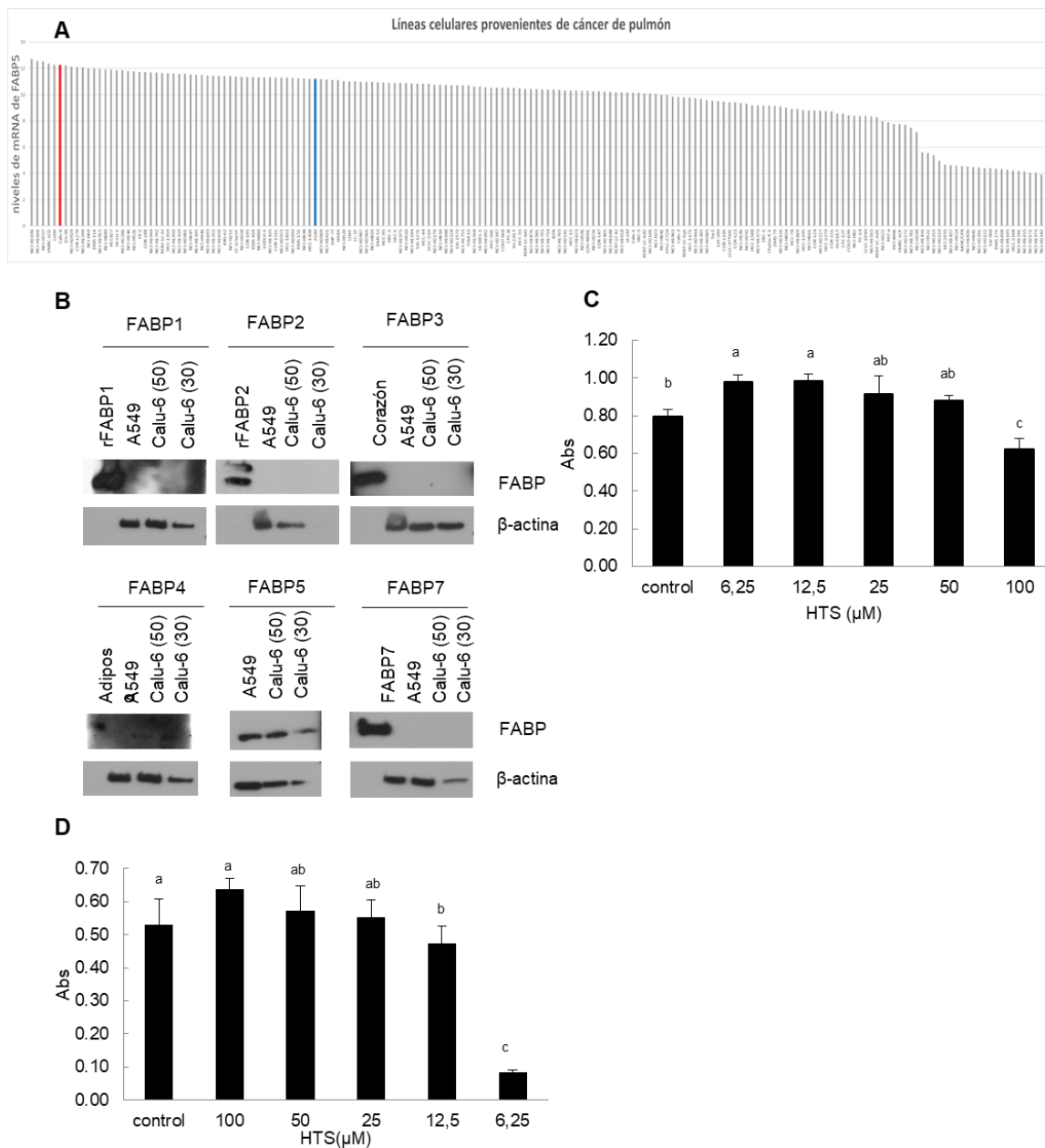
Para corroborar los resultados obtenidos en la proliferación de células A549 tratadas con HTS01037 y descartar posibles efectos inespecíficos de la droga, utilizamos un inhibidor de FABP5 y FABP7, SBF126, estructuralmente distinto a HTS01037 (Figura 11). Se ensayaron diferentes concentraciones de SBF126 por 24 hs y se determinó el número de células mediante recuento en cámara de Neubauer, la viabilidad utilizando el colorante tripán blue y los niveles de PARP, ciclinas B1 y D1 mediante Western Blot. La inhibición de FABP5 con SBF126 redujo significativamente el número de células, sin observarse células muertas (Figura 24 A). Adicionalmente los niveles de ciclina B1 y D1 se encontraron disminuidos en las células tratadas con el inhibidor (Figura 24 B). El perfil de ciclinas observado es similar al que se obtuvo al tratar las células con HTS01037 y en el modelo *knockdown* de FABP5. Estos resultados avalan que el efecto en la proliferación celular observado con HTS01037, es consecuencia de la inhibición de FABP5 y no de efectos inespecíficos de la droga.



**Figura 24:** El inhibidor SBF126, afecta la proliferación celular. A) Células A549 fueron incubadas por 24 hs con diferentes concentraciones del inhibidor SBF126 (específico para FABP5 y FABP7) o DMSO como control. El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer con azul de tripán. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n=3$ ). ANOVA. B) Los niveles de ciclina B1 y ciclina D1 fueron estimados mediante Western Blot en células A549 control y tratadas con SBF126 25  $\mu$ M y 100  $\mu$ M por 24 hs.

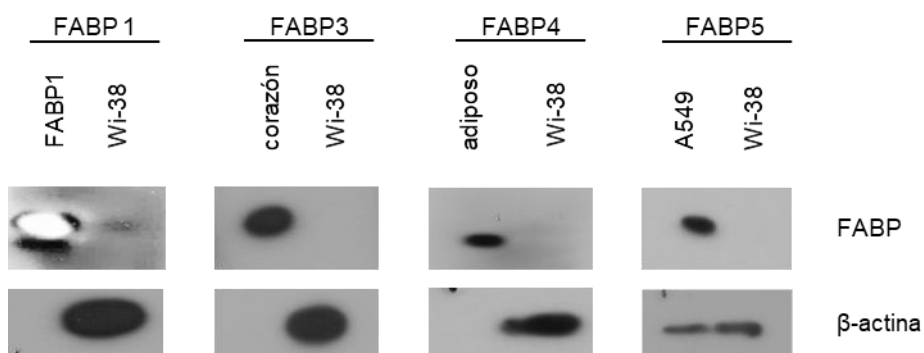
Adicionalmente evaluamos el efecto de HTS01037 en la proliferación en un modelo alternativo de adenocarcinoma de pulmón, la línea celular Calu-6, con alta expresión de FABP5 (Figura 25 A). El perfil de FABPs indicó que las células Calu-6 expresan las isoformas FABP4 y FABP5 (Figura 25 B). Notablemente, el tratamiento por 24 y 48hs

con el inhibidor pan específico de FABPs redujo la proliferación celular a 100  $\mu\text{M}$  y a 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 25 C y D). Estos resultados fueron obtenidos en el marco del trabajo final de licenciatura de María Elizabeth Martínez (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP), realizado bajo mi codirección.



**Figura 25:** La inhibición de FABP5 reduce la proliferación de células Calu-6: A) Análisis de expresión de FABP5 en líneas celulares provenientes de cáncer de pulmón. Los niveles de FABP5 en Calu-6 se muestran en color rojo y en A549 en azul. B) Perfil de expresión de FABPs en células Calu-6 utilizando controles positivos para cada isoforma: FABP1 y 2 de rata purificadas, homogenato de corazón y de tejido adiposo de rata, células A549 y FABP7 humana purificada. Como control de carga se utilizó  $\beta$ -actina. Células Calu-6 se trataron por 24 (C) y 48 hs (D) con distintas concentraciones de HTS01037 y se estimó el número de células con violeta cristal. Los resultados se expresan como la media  $\pm$ SD (n=3). ANOVA

La sobre expresión de FABP5 en células A549 no produjo cambios en la proliferación celular, probablemente debido a que esta línea, proveniente de células tumorales, posee una tasa de proliferación elevada y expresa niveles considerables de FABP5. Con el objetivo de evaluar si el aumento de los niveles de FABP5 incrementa la proliferación celular favoreciendo un fenotipo neoplásico se decidió utilizar una línea de fibroblastos normales proveniente de pulmón humano, WI-38. Inicialmente se realizó la caracterización de la línea celular evaluando los niveles de las isoformas de FABPs más ampliamente expresadas mediante Western Blot. No se detectaron niveles significativos de ninguna de las FABPs ensayadas (Figura 26), observándose sólo una banda tenue de FABP1. Dada la ausencia de FABP5 en la línea celular WI-38, decidimos utilizarla como modelo alternativo para estudiar los efectos de la sobre expresión de esta proteína en la proliferación celular. Realizamos numerosos intentos para generar un modelo de sobre expresión de FABP5 en WI-38 mediante la transfección con Lipofectamina o PEI del plásmido pcDNA3.1-hFABP5 bajo distintas condiciones, pero no fue posible generar una población estable de células transfectadas.



**Figura 26:** Niveles de FABPs en la línea celular WI-38 proveniente de fibroblastos de pulmón normales. Se utilizaron controles positivos para cada isoforma de FABP: Homogenato de corazón y tejido adiposo de rata, para FABP3 y 4, respectivamente, FABP1 de rata purificada y la línea celular A549, para FABP5.

Si bien no se logró evaluar el efecto de FABP5 en un contexto celular normal, en conjunto, los resultados sugieren que la inhibición de FABP5 en células proveniente de LUAD genera un arresto en el ciclo celular en la fase G0/G1 causando una reducción en la proliferación.

*FABP5 está involucrada en la adhesión y migración celular*

Analizamos, asimismo, el efecto de FABP5 sobre otros procesos alterados en las células tumorales, como la adhesión y la migración celular. Utilizando una tinción con violeta cristal de las células adheridas 2 hs post siembra, estudiamos la capacidad de adherirse de nuestros modelos celulares. Para ensayar el potencial rol de FABP5 en la migración celular se llevó a cabo el ensayo de la herida como se describe en materiales y métodos. En las células tratadas con el inhibidor y con uno de los siRNAs la adhesión celular se encontró reducida (Figura 27 A y B). En cambio, en el modelo de sobre expresión de FABP5 la capacidad de las células para adherirse al sustrato se incrementó significativamente (Figura 27 C). Al evaluar la migración celular se observó una mayor capacidad migratoria de células que sobre expresan FABP5 y el tratamiento con HTS0107 evidencia una tendencia opuesta (Figura 27 D, E, F y G).

Los resultados indican que FABP5 está involucrada en la capacidad de adhesión y migración de la línea celular A549.

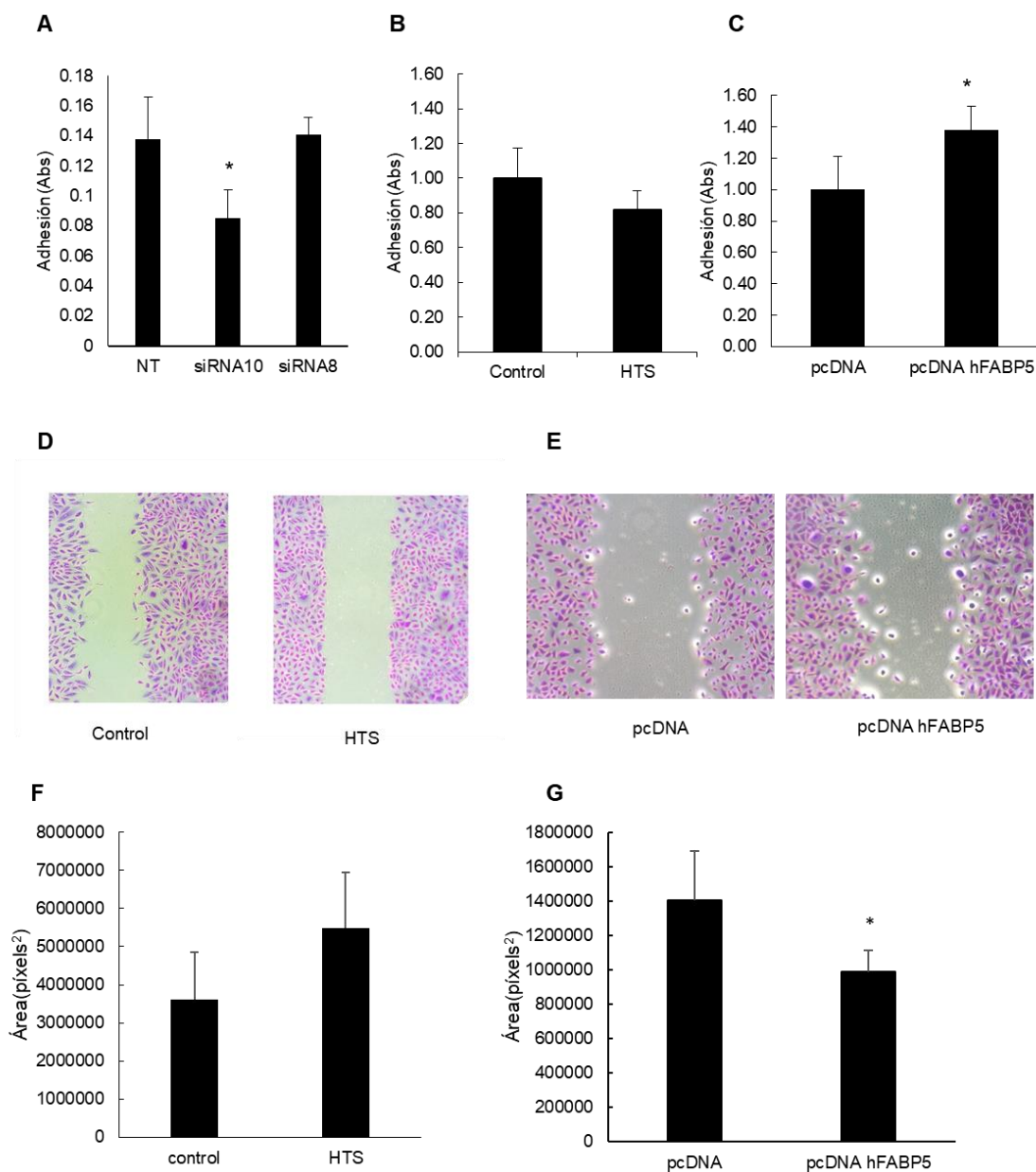
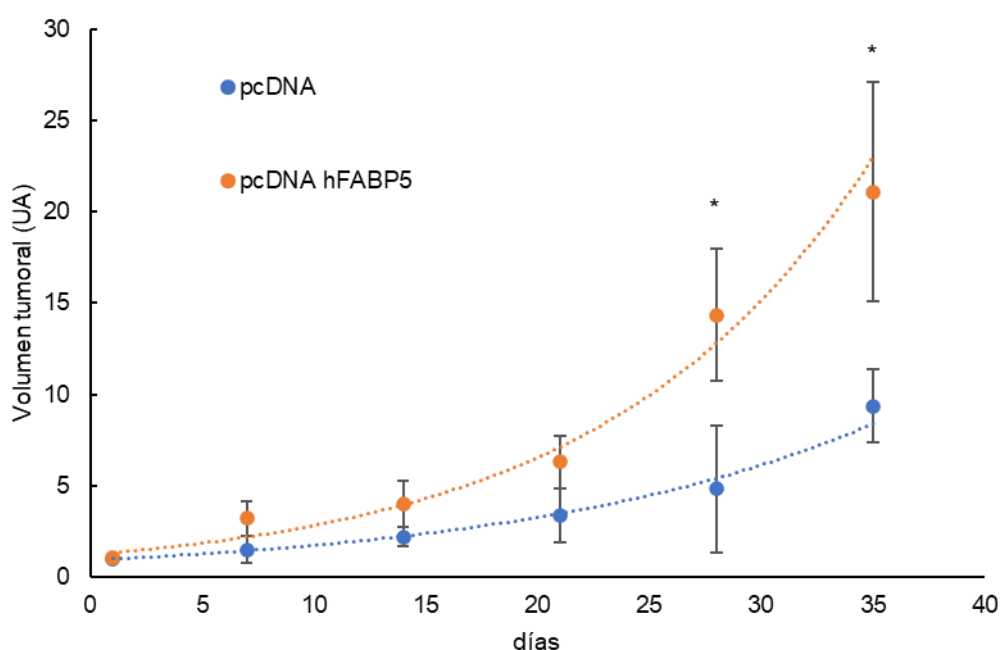


Figura 27: Los niveles de FABP5 afectan la capacidad de adhesión y migración celular. Células A549 knockdown para FABP5, tratadas con HTS01037 100  $\mu$ M por 24 hs o células que sobre expresan FABP5 (a, b y c respectivamente) se sembraron y, luego de 2 hs, las células adheridas se cuantificaron utilizando violeta cristal. D y E: imágenes representativas de la migración celular estimada a través del ensayo de la herida y tinción con violeta cristal en células A549 tratadas con HTS01037 100  $\mu$ M y el modelo de sobre expresión de FABP5. F y G: Cuantificación del área correspondiente a la herida en el ensayo de migración celular. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SD de un experimento representativo (n >3) \* p<0,05, t-test o ANOVA.

### FABP5 favorece el desarrollo tumoral in vivo

Se investigó el efecto de FABP5 en el crecimiento de la línea celular A549 en un modelo *in vivo* mediante la inoculación subcutánea de  $1 \times 10^6$  células pcDNA-hFABP5 o pcDNA en ratones *nude*. El volumen de los tumores se calculó con la fórmula indicada en Métodos y se graficó el volumen relativo al volumen inicial. Todos los ratones inoculados desarrollaron tumores a los 7 días. Los tumores provenientes de las células con niveles aumentados de FABP5 mostraron un incremento en la tasa de crecimiento respecto de aquellos desarrollados a partir de células control (Figura 28). Así, el tiempo de duplicación del volumen tumoral fue de 10,6 días para los tumores control y de 8,15 para los tumores que sobre expresan FABP5. Notablemente, los resultados sugieren que elevados niveles de FABP5 favorecen el crecimiento tumoral *in vivo*.



**Figura 28:** FABP5 favorece el crecimiento tumoral *in vivo*. Ratones *nude* se inocularon subepidérmicamente con  $1 \times 10^6$  células pcDNA o pcDNA-hFABP5 y el tamaño de los tumores se midió semanalmente con calibre. Se calculó el volumen del tumor utilizando la fórmula del elipsoide  $V = a^2 \times b \times 1/2$ , donde a es el ancho del tumor y b es la longitud, en milímetros. Los resultados se representan como la media del volumen relativo al volumen inicial  $\pm$ SD (n=4) \*p<0,05 ANOVA.

### Análisis transcriptómico

En modelos celulares generados en este trabajo, la alteración de los niveles de FABP5 conlleva a efectos pleiotrópicos en el metabolismo de lípidos, proliferación celular y adhesión, entre otros procesos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Asimismo, nuestros resultados sugieren un rol de la proteína en la regulación de la expresión génica. Con el

objetivo de identificar los procesos biológicos regulados transcripcionalmente por FABP5, los factores de transcripción que pueden mediar el efecto y los genes blanco responsables de la respuesta biológica, se llevó a cabo la secuenciación masiva de RNA en células A549 tratadas con el inhibidor HTS01037.

Hipótesis: FABP5 regula la transcripción de genes responsables de las alteraciones fenotípicas observadas previamente.

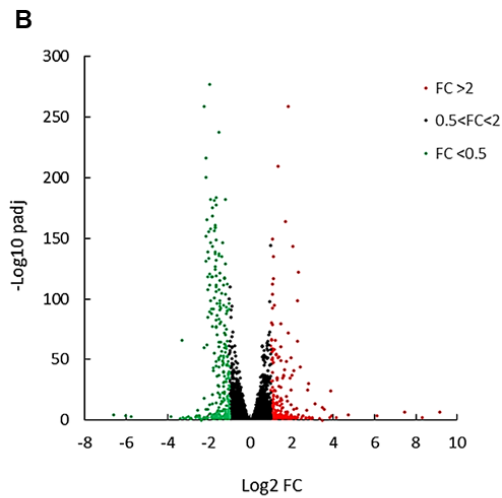
Brevemente, se extrajo el ARN total de células A549 tratadas con HTS01037 y células control (incubadas con el vehículo, DMSO) y se generó una biblioteca de cADN que posteriormente fue secuenciada. Las lecturas resultantes se mapearon y alinearon al genoma de referencia. Los resultados se normalizaron y se determinaron los genes diferencialmente expresados con DSEQ2. La única isoforma de FABPs que se transcribe en células A549 es la 5 (Figura 29 A), en concordancia con nuestros resultados obtenidos por Western Blot (Figura 8 C). Asimismo, encontramos una disminución en la transcripción de genes relacionados a la síntesis *de novo* de FA (FASN, SCD-1 y ACLY) al tratar las células con HTS01037, como observamos a nivel de proteína (Figura 29 C y 20 C). También hubo una correspondencia entre los niveles del ARN y la proteína en el caso de ciclina B1 (Figura 29 C y 23 E). Sin embargo, se observó un incremento de la transcripción de ciclina D1 y bajos niveles de la proteína por Western Blot (Figura 29 C y 23 E).

De un total de 19146 genes expresados, 5552 mostraron una expresión diferencial al inhibir FABP5 en células A549 (Figura 29 B). Entre ellos, 582 se encontraron sobre expresados o sub expresados más de dos veces (FC) respecto al grupo control (Figura 29 C, puntos rojos y verdes, respectivamente). El enriquecimiento funcional reveló que los genes significativamente aumentados al inhibir FABP5 estarían asociados a procesos de transporte transmembrana, utilizando la colección Gene Ontology para el análisis (Figura 29 D). De manera interesante, los genes que se sub expresan en células tratadas con el inhibidor de FABP5 están involucrados en diferentes procesos necesarios, principalmente, para la progresión en el ciclo celular (Figura 29 E).



**A**

Gen	FPKM Control	FPKM HTS
FABP1	0.000	0.000
FABP2	0.000	0.000
FABP3	0.000	0.000
FABP4	0.000	0.000
FABP5	158.711	153.159
FABP6	0.028	0.100
FABP7	0.000	0.000
FABP9	0.000	0.000
FABP12	0.000	0.000



Total de genes: 19146  
 ● 278 genes p-adj < 0.05, FC > 2  
 ● 304 genes p-adj < 0.05, FC < 0.5  
 ● genes p-adj < 0.05, 0.5 < FC < 2

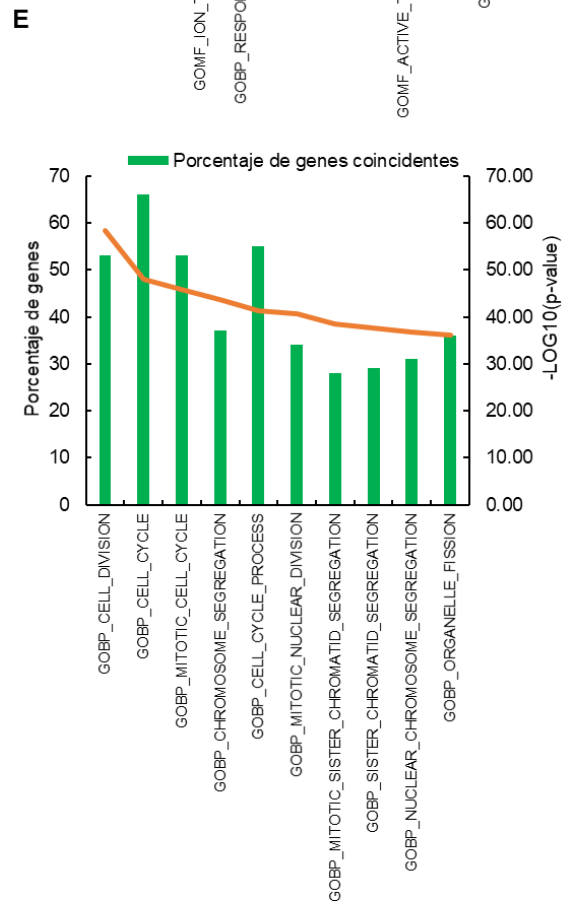
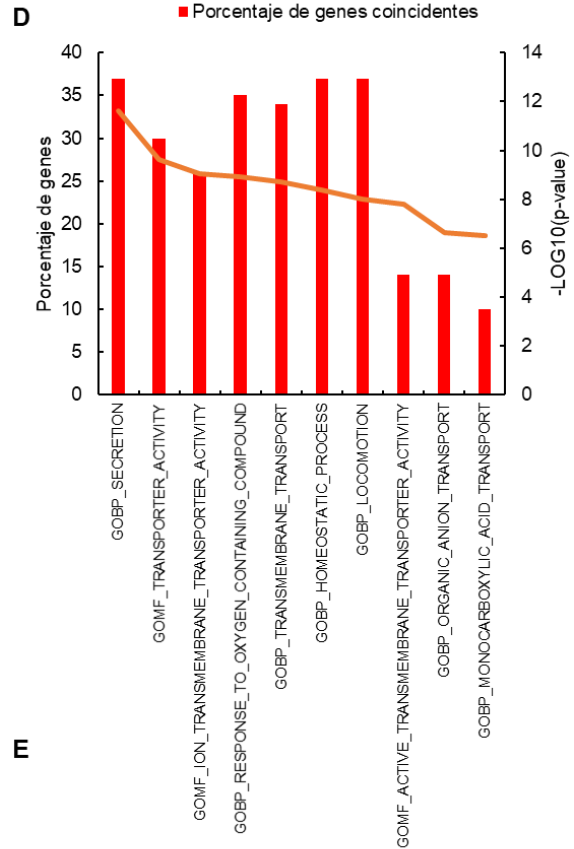
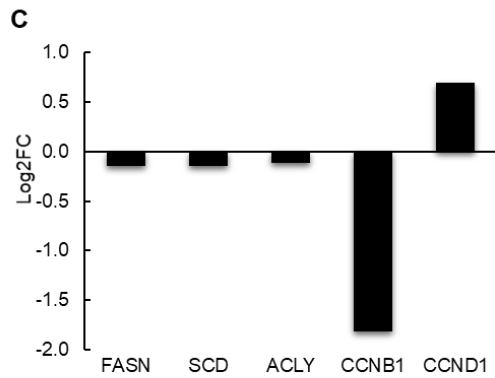


Figura 29: FABP5 regula la expresión génica a nivel transcripcional en células A549 A) Perfil de expresión de las isoformas de FABP en células A549 expresado como fragmentos por kilobase de transcritto por millón de lecturas mapeadas (FPKM). B) Volcano plot de la distribución de los genes diferencialmente expresados en células A4549 tratadas con HTS01037 respecto del control. Los genes diferencialmente expresados significativamente se resaltaron, con rojo los que se incrementaron con el tratamiento y con verde los que disminuyeron al menos dos veces respecto al control. FC: *fold change*. C) Expresión de los genes correspondientes a FASN, SCD-1, ACLY, ciclina D1 (CCND1) y ciclina B1 (CCNB1), en células A549 tratadas con HTS01037 respecto del control. D-E) Análisis de enriquecimiento funcional en Gene Ontology de los genes diferencialmente expresados, se graficaron las principales categorías significativamente enriquecidas. D) Top 10 de las categorías significativamente incrementadas en células A549 tratadas con el inhibidor de FABPs HTS01037 respecto del control. E) Top 10 de las categorías reducidas en células A549 tratadas con HTS01037 respecto del control.

Los resultados preliminares del análisis transcriptómico, sugieren que FABP5 tiene un papel importante en la regulación de la expresión génica. Adicionalmente, en conjunto con los estudios previos por citometría de flujo y Western Blot, indican que FABP5 controla la transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular. El mecanismo será investigado en el laboratorio a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

## DISCUSIÓN

FABP5 es una proteína citosólica que une FA con gran afinidad transportándolos hacia diferentes compartimentos celulares. Se ha asociado con el desarrollo y la progresión de varios tipos de cáncer, especialmente próstata y mama. Sin embargo, la función de FABP5 en el transporte de FA de células tumorales no ha sido completamente dilucidada. En el presente trabajo se planteó como hipótesis general que el aumento de FABP5 observado en cáncer es parte de la reprogramación metabólica de las células tumorales, direccionando los FA sintetizados *de novo* hacia la producción de membranas necesaria para mantener la proliferación celular. Asimismo, hipotetizamos que estos FA alteran la expresión génica mediante la transactivación de receptores nucleares por FABP5. Ambas funciones de FABP5 podrían contribuir a mantener el fenotipo celular transformado.

El LUAD es un cáncer de alta incidencia en la Argentina cuya reprogramación del metabolismo de lípidos está bien documentada [202]. El rol de FABP5 en LUAD no ha sido establecido. Un trabajo que integra los resultados de proteómica publicados indica que existen controversias respecto de los niveles de expresión de la proteína en NSCLC [203]. Aquí evaluamos los niveles de FABP5 en LUAD demostrando que son comparables con los niveles de expresión en aquellos cánceres donde se la ha asociado con la progresión tumoral. En el mismo sentido, en células derivadas de adenocarcinoma de pulmón humano (A549) los niveles de FABP5 fueron similares a los de líneas celulares de cáncer de mama. Particularmente, la línea celular A549 no expresa las isoformas 1,2,3,4 ni 7 de las FABPs. La ausencia de otras isoformas de FABPs permite evaluar individualmente la función de FABP5, además las células A549 dependen de la biosíntesis de lípidos para la proliferación [100, 127, 204, 205]. Por lo tanto, la línea A549 fue elegida para estudiar la participación de FABP5 en el metabolismo de los lípidos en un contexto de LUAD. Se establecieron modelos de sobre expresión estable y de inhibición genética o farmacológica de FABP5, con siRNAs o un pan inhibidor de FABPs (HTS01037) respectivamente.

Las células tumorales utilizan los FA principalmente para la síntesis de fosfolípidos, componentes esenciales de las membranas biológicas, para obtener energía y como moléculas señalizadoras. Entender el proceso que direcciona a los FA hacia determinadas vías metabólicas requiere considerar su naturaleza hidrofóbica y la necesidad de moverse en entornos acuosos. Debido a su capacidad de interactuar con membranas, las FABPs han sido asociadas a la captación de FA exógenos y su transporte hacia diferentes organelas [47]. Al evaluar el rol de FABP5 como

transportadora de FA en células provenientes de LUAD observamos que FABP5 no participa de la internalización de FA del medio, sin embargo, es necesaria para el direccionamiento de los mismos hacia la síntesis de lípidos complejos. La incorporación de FA exógenos en fosfolípidos, que constituyen la mayor clase de lípidos en células proliferativas, como también en otros lípidos menores, fue dependiente de los niveles de FABP5. En el mismo sentido, un estudio en neuronas reveló que FABP5 media la acción del factor de crecimiento neuronal en el desarrollo de neuritas, sugiriendo también, que es necesaria para la formación de fosfolípidos y la expansión de membranas [82]. Además, la inhibición de FABP5 redujo la secreción de lípidos complejos, componentes del surfactante pulmonar, al medio sin observarse diferencias relativas en las clases de lípidos secretadas contrariamente a lo reportado para otras isoformas de FABPs [57]. Nuestros resultados sugieren que FABP5 actúa en una etapa temprana de la síntesis de glicerolípidos que afecta la producción de todas las clases de lípidos complejos. Es importante, considerar que los FA deben ser activados por Acyl-CoA sintetetas (ACS) para participar de diferentes vías metabólicas. Distintas isoformas de ACS pueden expresarse simultáneamente en un tipo celular con diferentes localizaciones subcelulares que podrían determinar el destino de los FA [206]. Así, FABP5 podría unir y transportar los FA libres hacia isoformas específicas de ACS promoviendo la síntesis de lípidos complejos. En la actualidad no existen reportes que demuestren la interacción entre FABP5 y estas proteínas, sin embargo, FABP5 regula la expresión de ACS1 en células derivadas de cáncer de próstata, mama e hígado [174, 207]. Además, resultados preliminares del análisis transcriptómico en células A549 tratadas con HTS01037 indican que FABP5 regula la expresión de enzimas que participan en la síntesis de fosfolípidos. Así, FABP5 podría promover la síntesis de glicerolípidos mediante el direccionamiento de FA o bien por la regulación de la expresión génica de enzimas involucradas en la síntesis de lípidos complejos.

En el presente trabajo mostramos, mediante ensayos de incorporación de C<sup>14</sup> acetato, que FABP5 promueve la síntesis *de novo* de FA en células de LUAD, proceso que ocurre enteramente en el citosol. Algunos trabajos recientes proponen una relación entre FABP5 y la síntesis *de novo* de FA, aunque sin ensayarla directamente, basados en la relación entre los niveles de expresión de FABP5 y enzimas que participan de la síntesis endógena de FA [191, 207]. Al igual que lo observado con palmitato exógeno, los FA endógenos fueron utilizados para la producción de fosfolípidos principalmente, sin encontrarse cambios en la incorporación relativa en las distintas clases de lípidos, apoyando la participación de FABP5 en la síntesis de lípidos complejos. Los FA libres son deletéreos en concentraciones elevadas en el citosol. Así, es probable que las

células regulen la síntesis endógena de FA dependiendo de la cantidad de FABP disponible para solubilizarlos. Al igual que en otros tipos de cáncer, en LUAD FABP5 controla los niveles de enzimas que participan de la síntesis *de novo* de FA (FASN, SCD-1 y ACLY) indicando que, al menos en parte, ejerce su rol mediante la regulación de la expresión génica. Evidencia adicional que une FABP5 con esta vía proviene de la utilización de C75; la inhibición de FASN redujo los niveles de FABP5 sugiriendo una regulación recíprocamente coordinada. La conexión entre FABP5 y FASN ha sido propuesta recientemente en cáncer de próstata. En ese trabajo, los autores concluyen que FABP5 es necesaria para transportar los FA exógenos y endógenos al núcleo, activando la expresión de genes que promueven la metástasis [64]. Los resultados aquí presentados podrían tener importantes implicancias terapéuticas, ya que varias enzimas de la síntesis *de novo* de FA son consideradas blancos terapéuticos para el cáncer [116, 121, 125-127, 136]. Sin embargo, a pesar de que diversos inhibidores han mostrado resultados prometedores en modelos pre clínicos, la única enzima de la vía que ha llegado a fase dos de ensayos clínicos como blanco terapéutico es FASN (incluyendo un ensayo para NSCLC, NCT03808558).

Como se mencionó anteriormente, los FA también son utilizados como fuente de energía. Sin embargo, en células de LUAD, FABP5 no modifica el metabolismo energético celular a través de la oxidación de FA. La deficiencia de algunas isoformas de FABPs reducen el direccionamiento de los FA exógenos hacia su oxidación, lo cual es compensado por un incremento de la oxidación de glucosa [60, 208, 209]. En el mismo sentido, un reporte en células T diferenciadas sugiere que la inhibición de FABP5 resulta en una desregulación de la función mitocondrial reduciendo la fosforilación oxidativa y en consecuencia un cambio metabólico hacia la glucólisis [86]. En los modelos celulares generados en el presente trabajo, con niveles alterados de FABP5, no se evidenciaron modificaciones en la oxidación de FA ni cambios en la glucólisis, estimada por los niveles de lactato producidos. Resultados similares se reportaron recientemente en células de cáncer cervical [191], sugiriendo que FABP5 puede tener una función metabólica comparable en distintos tipos de cáncer.

La capacidad promotora tumoral de FABP5 se ha asociado principalmente con su rol como transportadora de FA al núcleo para la activación de receptores nucleares. Un trabajo reciente en células A549 muestra la interacción de FABP5 con un ARN largo no codificante (lncRNA) que favorece su ingreso al núcleo [210]. En este trabajo también observamos la presencia de FABP5 en el núcleo y su inhibición modificó los niveles de ARN mensajero de 5552 proteínas revelando el rol esencial de FABP5 en la regulación de la expresión génica. Notablemente, los principales genes regulados directamente por

FABP5 forman parte de procesos asociados al ciclo celular. En el mismo sentido, el análisis bioinformático en líneas celulares derivadas de LUAD, señala que los niveles de FABP5 se corresponden con los de transcritos relacionados al ciclo celular y la transcripción.

En diversos cánceres FABP5 tiene un papel esencial en la regulación de la expresión génica mediada por la activación de PPAR $\beta/\delta$  por ácido retinoico o ligandos sintéticos [167, 170, 200], aunque la función de este PPAR en el cáncer está en discusión [211]. Es poco probable que el rol de FABP5 en nuestro modelo esté relacionado con PPAR  $\beta/\delta$ , ya que no se encontró expresado en A549. Más aún, la expresión de un gen target del receptor, ILK, disminuye al sobre expresar FABP5. Sin embargo, otras isoformas de PPARs podrían mediar el rol de FABP5 en la expresión génica. En cáncer de próstata niveles elevados de FABP5 promueven la expansión tumoral a través del transporte de FA libres al núcleo y la activación de PPAR $\gamma$  [166, 173]. A pesar de los intentos por evaluar esta hipótesis mediante el ensayo reportero de luciferasa, no podemos descartar este mecanismo en nuestro modelo. Por otra parte, algunos trabajos han mostrado que FABP5 regula la expresión génica por mecanismos independientes de PPAR [174, 207]. Nuevas líneas de investigación de nuestro laboratorio abordan específicamente el mecanismo utilizado por FABP5 para regular la expresión génica en LUAD basadas en las observaciones realizadas en este trabajo.

Resultados del análisis transcriptómico y los niveles de enzimas que participan del metabolismo de FA muestran, aunque de forma preliminar, que el efecto generado al inhibir FABP5 es más notable en las proteínas que a nivel de ARN mensajero. En particular, los niveles de ARN mensajero correspondiente a ciclina D1 se encuentran elevados al tratar las células con HTS01037 pero la cantidad de proteína es menor con el tratamiento. Por lo tanto, es importante considerar un posible rol de FABP5 en la regulación post transcripcional de las proteínas, o bien, en la degradación de las mismas. A favor de estas hipótesis, se ha descrito que FABP5 promueve la traducción de HIF1 $\alpha$ , además de activarlo, en células provenientes de hepatocarcinoma [174]. Asimismo, se reportó que FABP5 previene la degradación proteosomal de EGFR en cáncer de mama [157]. Por lo tanto, en células de LUAD, FABP5 podría estar involucrada en diferentes vías y procesos celulares además de transportar FA y translocar al núcleo para activar receptores nucleares que regulan la transcripción génica.

Como consecuencia de la participación de FABP5 en el metabolismo de lípidos y la expresión de una gran cantidad de genes en LUAD, esta proteína favorece el fenotipo tumoral. Al igual que en otros tipos de cáncer [155, 157, 163, 166, 170, 191], FABP5

tiene un fuerte impacto en la proliferación celular *in vitro*, la migración, adhesión y el crecimiento tumoral *in vivo* de LUAD. La inhibición o *knockdown* de FABP5 produce arresto del ciclo celular en la fase G0/G1, observado por citometría de flujo y cambios en los niveles de ciclinas. En células provenientes de cáncer de colon se encuentran resultados similares al reducir los niveles de FABP5 [165]. Sin embargo, el arresto del ciclo celular podría deberse a la inhibición de FABP5 o ser una consecuencia de la reducción en los niveles de enzimas lipogénicas, dado que la inhibición individual de SCD-1, FASN y ACLY conduce al bloqueo del ciclo celular [121, 136, 212].

El efecto de FABP5 en la proliferación de células derivadas de LUAD es mayor al utilizar inhibidores de FABP5, que interrumpen la unión a los FA, con respecto a los modelos de sobre expresión y *knockdown*. Probablemente, en el modelo *knockdown* la presencia de una cantidad remanente de proteína permite sostener la proliferación celular. Asimismo, en el modelo de sobre expresión se incrementa el nivel de la proteína en una línea celular que inicialmente presenta grandes cantidades de FABP5 y una tasa de proliferación elevada, lo cual podría enmascarar su efecto en la proliferación celular. Sin embargo, el crecimiento de los tumores que sobre expresan FABP5 *in vivo* reveló un rol importante en el desarrollo tumoral que no puede explicarse simplemente por cambios en la proliferación. En cáncer de próstata, se ha asociado el efecto promotor tumoral de FABP5 a su capacidad de activar PPAR $\gamma$  y regular la expresión de VEGF [155, 166, 173]. VEGF es secretado por células tumorales para activar la angiogénesis promoviendo la disponibilidad de oxígeno y nutrientes. Serán necesarios más estudios para establecer si ese mecanismo media el rol de FABP5 en el desarrollo tumoral de células de LUAD.

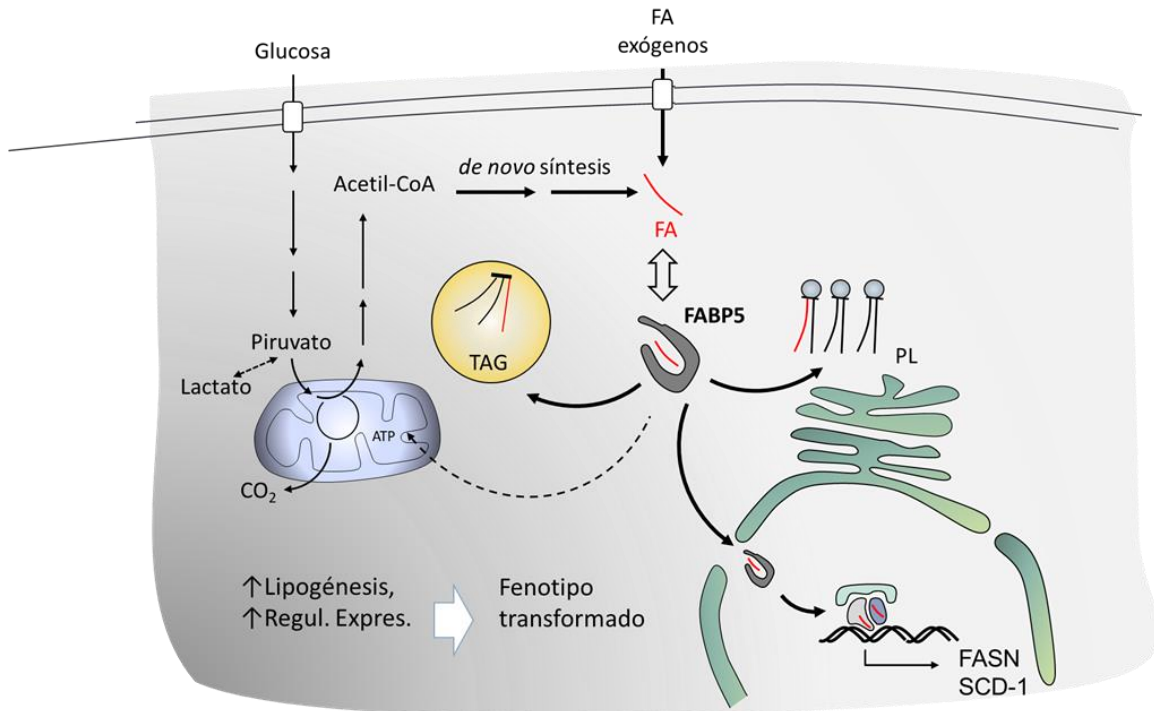
En el presente trabajo revelamos, mediante ensayos bioinformáticos, que los niveles de expresión de FABP5 correlacionan con una menor probabilidad de supervivencia específicamente en LUAD, dado que no tiene valor pronóstico en LUSC. La relación de FABP5 con la diferenciación, metástasis y pronóstico en tumores escamosos no es clara y distintos estudios han mostrado resultados variables [213, 214]. Las alteraciones moleculares específicas de LUSC y LUAD que conllevan al comienzo y la progresión tumoral podrían explicar la diferencia entre los mismos [215-217]. FABP3 y FABP4 se han relacionado con un mayor grado del tumor y con un peor pronóstico en NSCLC [218]. Sin embargo, FABP5 podría ser considerada como biomarcador específico para LUAD. Escasos reportes bibliográficos asocian FABP5 con cáncer de pulmón. El único análisis serológico en ese tipo de cáncer sólo evalúa 7 muestras correspondientes a pacientes con LUAD y no muestra diferencias entre los niveles de la proteína respecto de los individuos sanos [219].

En conjunto, nuestros resultados *in vitro* e *in vivo*, así como el análisis bioinformático en tumores sugieren que FABP5 podría ser un nuevo blanco terapéutico en LUAD. Aquí mostramos que FABP5 regula el nivel de varias enzimas de la vía de síntesis endógena de FA simultáneamente. Además, afecta la incorporación de FA exógenos y endógenos en lípidos complejos, principalmente fosfolípidos. Esto es especialmente importante en cánceres (NSCLC dirigido por Kras) que además de depender de la síntesis *de novo* [100, 127, 204, 205], toman lípidos del medio extracelular [142]. Así, la inhibición de FABP5 podría tener un mayor impacto en el metabolismo tumoral de FA, que bloquear enzimas de la ruta biosintética individualmente. Además, una estrategia inhibitoria combinada dirigida a FABP5 podría prevenir el incremento compensatorio de la síntesis *de novo* de FA que ocurre cuando se inhibe la captación de FA [220]. Serán necesarios nuevos estudios para estratificar los pacientes que pudieran beneficiarse de la inhibición de la proteína. La “traslación” a la clínica dependerá asimismo del desarrollo de nuevos inhibidores potentes y específicos dado que se requieren altas dosis para inhibir FABP5 con los disponibles actualmente.

## CONCLUSIÓN

Este trabajo provee nuevas evidencias del rol de FABP5 en cáncer. Aquí mostramos que FABP5 es necesaria la síntesis *de novo* de FA y la acilación de lípidos complejos (tanto con FA exógenos como endógenos) en LUAD, mientras que no tiene efecto en las vías oxidativas. FABP5 regula la expresión de enzimas lipogénicas incluyendo FASN y SCD1 sugiriendo que está involucrada en la reprogramación metabólica tumoral (Figura 30). Además, la inhibición de FABP5 genera cambios notables en el perfil transcriptómico de células derivadas de LUAD. En concordancia con las alteraciones del metabolismo de lípidos y de la expresión génica, FABP5 tiene un papel fundamental en la progresión en el ciclo celular, adhesión y migración *in vitro*, y desarrollo tumoral *in vivo*. Finalmente, elevados niveles de expresión de FABP5 se asocian con peor pronóstico en pacientes con LUAD. Nuestros resultados posicionan a FABP5 como un blanco en el metabolismo lipídico y un nuevo biomarcador potencial para el pronóstico y tratamiento de LUAD.





**Figura 30:** FABP5 es necesaria para la síntesis *de novo* de FA y une FA (exógenos y endógenos) direccionándolos hacia vías de síntesis de lípidos complejos sin alterar su catabolismo *in vitro*. Además, es capaz de translocar al núcleo y regular la expresión génica de un gran número de proteínas incluyendo enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos. A través de ambas funciones FABP5 participaría de la reprogramación metabólica y la promoción del fenotipo neoplásico por contribuir en el avance del ciclo celular, la migración y el desarrollo tumoral *in vivo*.

## REFERENCIAS

1. Ferlay J, et al., *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. 2018.
2. Isabel Ballesteros and María Graciela Abriata, *BOLETÍN VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA. Análisis de Situación de Salud por Cáncer*. 2018.
3. Malhotra, J., et al., *Risk factors for lung cancer worldwide*. Eur Respir J, 2016. **48**(3): p. 889-902.
4. Travis W.D, et al., *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2004.
5. Tokujiro Yano, et al., *Never-smoking Nonsmall Cell Lung Cancer as a Separate Entity Clinicopathologic Features and Survival*. American Cancer Society, 2008.
6. Bryan Chan and Brett Hughes, *Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future*. Translational lung cancer research, 2015. **4**(1).
7. Mark G Kris, et al., *Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs*. JAMA, 2014. **311**(19).
8. Sai F. Yeung, et al., *Profiling of Oncogenic Driver Events in Lung Adenocarcinoma Revealed MET Mutation as Independent Prognostic Factor*. Journal of Thoracic Oncology, 2015. **10**(9).
9. Yuanxiang Wang, et al., *Targeting Mutant KRAS for Anticancer Therapeutics: A Review of Novel Small Molecule Modulators*. J Med Chem, 2013.
10. David L Nelson and Michael M Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry Fifth Edition*.
11. Eoin Fahy, et al., *A comprehensive classification system for lipids*. Eur. J. Lipid Sci. Technol, 2005. **107**: p. 337–364.
12. Gerrit van Meer, Dennis R. Voelker, and Gerald W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol 2008. **9**.
13. Ludwig Weiss, et al., *Fatty-Acid Biosynthesis in Man, a Pathway of Minor Importance*. Biol Chem, 1986. **367**.
14. Takashi Kusakabe, et al., *Fatty Acid Synthase Is Expressed Mainly in Adult Hormone-sensitive Cells or Cells with High Lipid Metabolism and in Proliferating Fetal Cells*. JHC, 2000. **48**.
15. Jeffrey R. Simard, Biju K. Pillai, and James A. Hamilton, *Fatty Acid Flip-Flop in a Model Membrane Is Faster Than Desorption into the Aqueous Phase*. Biochemistry, 2008. **47**: p. 9081-9089.
16. Robert Ehehalt, et al., *Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane – lipid rafts and fatty acid transport proteins*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2004. **284**.
17. Nada A. Abumrad and Ira J. Goldberg, *CD36 actions in the Heart: lipids, calcium, inflammation, repair and more?* Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017. **18**(60): p. 1442–144.
18. Ty T. KimJason and R.B Dyck, *The Role of CD36 in the Regulation of Myocardial Lipid Metabolism*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2016. **1861**.

19. Jan F.C. Glatz, et al., *Regulation of the subcellular trafficking of CD36, a major determinant of cardiac fatty acid utilization*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016. **1861**.
20. Arend Bonen, et al., *Acute Regulation of Fatty Acid Uptake Involves the Cellular Redistribution of Fatty Acid Translocase*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(19).
21. Joost J.F.P. Luiken, et al., *Insulin Stimulates Long-Chain Fatty Acid Utilization by Rat Cardiac Myocytes Through Cellular Redistribution of FAT/CD36*. *Diabetes*, 2002. **51**.
22. Joost J.F.P. Luiken, et al., *Contraction-Induced Fatty Acid Translocase/CD36 Translocation in Rat Cardiac Myocytes Is Mediated Through AMP-Activated Protein Kinase Signaling*. *Diabetes*, 2003. **52**.
23. Joost Luiken, et al., *Post-translational modifications of CD36 (SR-B2): Implications for regulation of myocellular fatty acid uptake*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2016. **1862**(12).
24. Adrienne N. Boone, et al., *Bimodal Activation of Acetyl-CoA Carboxylase by Glutamate*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(15).
25. Barbara B. Kahn, et al., *AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism*. *Cell Metabolism*, 2005. **1**.
26. Lee A. Witters, et al., *Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988. **85**.
27. Dalila Azzout-Marniche, et al., *Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes*. *Biochem. J.*, 2000. **350**: p. 389±393.
28. Guosheng Liang, et al., *Diminished Hepatic Response to Fasting/Refeeding and Liver X Receptor Agonists in Mice with Selective Deficiency of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(11): p. 9520–9528.
29. Yu Li, et al., *AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-induced Insulin Resistant Mice*. *Cell Metabolism*, 2011. **13**(4): p. 376–388.
30. Eugene P Kennedy and Samuel B Weiss, *The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides*. *Journal of Biological Chemistry*, 1956.
31. Lesley Drynan, Patti A. Quantand, and Victor A. Zammit, *Flux control exerted by mitochondrial outer membrane carnitine palmitoyltransferase over  $\beta$ -oxidation, ketogenesis and tricarboxylic acid cycle activity in hepatocytes isolated from rats in different metabolic states*. *Biochem. J.*, 1996. **317**: p. 791-795.
32. Toshifumi Aoyama, et al., *Altered Constitutive Expression of Fatty Acid-metabolizing Enzymes in Mice Lacking the Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )*. *The Journal Of Biological Chemistry*, 1998. **273**(10): p. 5678–5684.
33. Tanaka, et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  induces fatty acid  $\beta$ -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(26): p. 15924–15929.
34. Janice M Huss, Ryan P Kopp, and Daniel P Kelly, *Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) Coactivates the Cardiac-enriched Nuclear Receptors Estrogen-related Receptor- $\alpha$  and - $\gamma$* . *The Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(43).

35. J. Denis McGarry, Guy Mannaerts, and Daniel W. Foster, *A Possible Role for Malonyl-CoA in the Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis*. The Journal of Clinical Investigation, 1977. **60**: p. 265-270.
36. J Denis McGarry, George F Leatherman, and Daniel W Foster, *Carnitine palmitoyltransferase I the site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-coa*. The Journal of Biological Chemistry, 1977. **253**(12).
37. Glass C. K and S. Ogawa, *Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(1): p. 44-55.
38. Timothy M Willson, et al., *The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery*. Journal of Medicinal Chemistry, 2000. **43**(4).
39. Yessoufou, A. and W. Wahli, *Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels*. Swiss Med Wkly, 2010. **140**.
40. Bethany A Janowski, et al., *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR $\alpha$* . Nature, 1996. **383**.
41. Jiafu Ou, et al., *Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand dependent activation of the LXR*. PNAS, 2001. **98**(11).
42. Rachel Hertz, et al., *Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4a*. Nature, 1998. **392**.
43. Graham P Hayhurst, et al., *Hepatocyte Nuclear Factor 4a (Nuclear Receptor 2A1) Is Essential for Maintenance of Hepatic Gene Expression and Lipid Homeostasis*. Molecular and Cellular Biology, 2001. **21**(4): p. 1393–1403.
44. Markus Stoffel and Stephen A Duncan, *The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4a regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94**: p. 13209–13214.
45. Amy K Walker, et al., *A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans*. Cell, 2011. **147**(4).
46. Furuhashi, M. and G.S. Hotamisligil, *Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(6): p. 489.
47. Storch J and Corsico B, *The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins*. Annual Review of Nutrition, 2008. **28**: p. 73-95.
48. James Thompson, et al., *The Crystal Structure of the Liver Fatty Acid-binding Protein*. The Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(11): p. 7140–7150.
49. Chmurzyńska, A., *The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism*. J Appl Genet, 2006. **47**(1): p. 39–48.
50. Leonard Banasuk, et al., *Lipid-binding proteins: A family of fatty acid and retinoid transport proteins*. Advances In Protein Chemistry, 1994. **45**.
51. Ann Vogel Hertzfel and David A Bernlohr, *The Mammalian Fatty Acid-binding Protein Multigene Family: Molecular and Genetic Insights into Function*. TEM, 2000. **11**(5).
52. Corsico, B., et al., *The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12174-8.

53. Corsico, B., H.L. Liou, and J. Storch, *The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes*. *Biochemistry*, 2004. **43**(12): p. 3600-7.
54. Corsico, B., et al., *Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(8): p. 1765-72.
55. Falomir-Lockhart, L.J., et al., *Protein-membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid-binding protein to membranes. Support for a multistep process*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(20): p. 13979-89.
56. Franchini, G.R., J. Storch, and B. Corsico, *The integrity of the alpha-helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1781**(4): p. 192-9.
57. Rodriguez Sawicki, L., et al., *FABP1 knockdown in human enterocytes impairs proliferation and alters lipid metabolism*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017. **1862**(12): p. 1587-1594.
58. Eric J Murphy, et al., *Liver fatty acid-binding protein expression in transfected fibroblasts stimulates fatty acid uptake and metabolism*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996. **1301**: p. 191-198
59. Montoudis, A., et al., *Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion beta-oxidation and cholesterol uptake*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(5): p. 961-72.
60. Bert Binas, et al., *Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization*. *The FASEB Journal BINAS ET*, 1999. **13**: p. 805-812.
61. Avery L. McIntosha, et al., *Liver-type fatty acid binding protein interacts with hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$* . *FEBS Lett*, 2014.
62. Heather A Hostetler, et al., *L-FABP directly interacts with PPAR in cultured primary hepatocytes*. *Journal of Lipid Research*, 2009. **50**.
63. Nguan-Soon Tan, et al., *Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(14): p. 5114-27.
64. Carbonetti, G., et al., *FABP5 coordinates lipid signaling that promotes prostate cancer metastasis*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 18944.
65. Rebecca L Smathers and Dennis R Petersen, *The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions*. *Human Genomics*, 2011. **5**(3).
66. Madsen, P., et al., *Molecular Cloning and Expression of a Novel Keratinocyte Protein(Psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that Is Highly Up-Regulated in Psoriatic Skin and that Shares Similarity to Fatty Acid-Binding Proteins*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1992. **99**.
67. George Siegenthaler, et al., *Characterization and expression of a novel human Fatty Acid Binding Protein: The Epidermal Type( EFABP)*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1993. **190**.
68. Bertram Bleck, et al., *Cloning and chromosomal localisation of the murine epidermal-type fatty acid binding protein gene (FABPE)*. *Gene*, 1998. **215**.
69. Carsten Hohoff, et al., *Expression, Purification, and Crystal Structure Determination of Recombinant Human Epidermal-Type Fatty Acid Binding Protein*. *Biochemistry*, 1999. **38**.

70. Benoit Sanson, et al., *Crystallographic study of FABP5 as an intracellular endocannabinoid transporter*. Acta Crystallographica, 2014.
71. Eric H Armstrong, et al., *Structural Basis for Ligand Regulation of the Fatty Acid binding protein 5, Peroxisome Proliferator-activated Receptor / (FABP5-PPAR/ ) Signaling Pathway*. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2014. **289**.
72. Yuji Owada, et al., *Altered Water Barrier Function in Epidermal-Type Fatty Acid Binding Protein-Deficient Mice*. The Journal of Investigative Dermatology, 2002. **118**(3).
73. Yuji Owada, et al., *Analysis on the phenotype of E-FABP-gene knockout mice*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2002. **239**.
74. Kazuhisa Maeda, et al., *Role of the Fatty Acid Binding Protein mal1 in Obesity and Insulin Resistance*. Diabetes, 2003. **52**.
75. Hertzfel, A.V., A. Bennaars-Eiden, and D.A. Bernlohr, *Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 2105-11.
76. Gokhan S Hotamisligil, et al., *Uncoupling of Obesity from Insulin Resistance Through a Targeted Mutation in aP2, the Adipocyte Fatty Acid Binding Protein*. Science, 1996. **274**.
77. Guthmann, F., et al., *Phenotype of palmitic acid transport and of signalling in alveolar type II cells from E/H-FABP double-knockout mice: contribution of caveolin-1 and PPARgamma*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1636**(2-3): p. 196-204.
78. Kazuhisa Maeda, et al., *Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes*. Cell Metabolism, 2005. **1**.
79. Tatsuya Iso, et al., *Capillary Endothelial Fatty Acid Binding Proteins 4 and 5 Play a Critical Role in Fatty Acid Uptake in Heart and Skeletal Muscle*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**.
80. Eisaku Ogawa, et al., *Epidermal FABP (FABP5) Regulates Keratinocyte Differentiation by 13(S)-HODE-Mediated Activation of the NF-jB Signaling Pathway*. Journal of Investigative Dermatology, 2011.
81. Jo-Wen Liu, et al., *Expression of E-FABP in PC12 cells increases neurite extension during differentiation: involvement of n-3 and n-6 fatty acids*. J Neurochem, 2008. **106**.
82. Gregory W. Allen, Jo-Wen Liu, and Marino De Leon, *Depletion of a fatty acid-binding protein impairs neurite outgrowth in PC12 cells*. Molecular Brain Research, 2000. **76**: p. 315–324.
83. Chen-Wei Yu, et al., *Dual role of fatty acid-binding protein 5 on endothelial cell fate: a potential link between lipid metabolism and angiogenic responses*. Angiogenesis, 2016. **19**.
84. Diane Bogdan, et al., *Fatty acid-binding protein 5 controls microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1) induction during inflammation*. Journal of Biological Chemistry, 2018. **293**(14): p. 5295–5306.
85. Shuiliang Yu, et al., *Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) regulates cognitive function both by decreasing anandamide levels and by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ) in the brain*. The Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(18): p. 12748–12758.

86. Cameron S Field, et al., *Mitochondrial Integrity Regulated by Lipid Metabolism Is a Cell-Intrinsic Checkpoint for Treg Suppressive Function*. *Cell metabolism*, 2020. **31**: p. 422–437.
87. Nowell, P.C., *The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations*. *Science*, 1976. **194**.
88. Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. *Cell*, 2000. **100**.
89. Douglas Hanahan and Robert A Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 2011. **144**.
90. Simona Negrini, Vassilis G Gorgoulis, and Thanos D Halazonetis, *Genomic instability — an evolving hallmark of cancer*. *NATURE REVIEWS*, 2010. **11**.
91. TL Whiteside, *The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth*. *Oncogene*, 2008. **27**(45).
92. Kathryn Bieging, *Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression*. *Nature Review Cancer*, 2014. **14**(5): p. 359–370.
93. Clearence Magnard, et al., *BRCA1 interacts with acetyl-CoA carboxylase through its tandem of BRCT domains*. *Oncogene*, 2002. **21**: p. 6729 – 6739.
94. Karen Moreau, et al., *BRCA1 Affects Lipid Synthesis through Its Interaction with Acetyl-CoA Carboxylase*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**.
95. Fionnuala Morrish, et al., *c-Myc activates multiple metabolic networks to generate substrates for cell cycle entry*. *Oncogene*, 2009. **28**.
96. Hidekazu Takahashi, et al., *Nucleocytoplasmic Acetyl-Coenzyme A Synthetase Is Required for Histone Acetylation and Global Transcription*. *Molecular Cell*, 2006. **23**(2): p. 207-17.
97. Luciano Galdieri and Ales Vancura, *Acetyl-CoA Carboxylase Regulates Global Histone Acetylation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**.
98. Gopinath Sutendra, et al., *A Nuclear Pyruvate Dehydrogenase Complex Is Important for the Generation of Acetyl-CoA and Histone Acetylation*. *Cell* 2014. **158**: p. 84–97.
99. Kathryn E. Wellen, et al., *ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation*. *Science*, 2009. **324**.
100. Scaglia, N., J.W. Chisholm, and R.A. Igal, *Inhibition of stearoylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK*. *PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6812.
101. Shimin Zhao, et al., *Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 $\alpha$* . *Science*, 2009. **324**.
102. Hui Qin Wang, et al., *Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells*. *Oncogene*, 2005. **24**.
103. Serge Hardy, Yves Langelier, and Marc Prentki, *Oleate Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Promotes proliferation and Reduces Apoptosis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, Whereas Palmitate Has Opposite Effects*. *Cancer Res*, 2000. **60**: p. 6353–6358.
104. Warburg, O., *On the Origin of Cancer Cells*. *Biochem*, 1956. **123**: p. 309-314.
105. P Som, et al., *A Fluorinated Glucose Analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose(F-18): Nontoxic Tracer for Rapid Tumor Detection*. *J Nuci Med*, 1980. **21**(7).

106. Sophia Y Lunt and Matthew G Vander Heiden, *Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. The Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2011. **27**: p. 441–64.
107. Karen G de la Cruz-López, et al., *Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and therapeutic Approaches*. Front. Oncol, 2019.
108. Lindsey K Borouhgs and Ralph J DeBerardinis, *Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth*. Nat Cell Biol., 2015. **17**(4).
109. Christopher S Ahn and Christian M Metallo, *Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation*. Cancer & Metabolism, 2015. **3**(1).
110. Ralph J. DeBerardinis and Tzuling Cheng, *Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer*. Oncogene, 2010. **29**(3): p. 313–324.
111. Ralph J DeBerardinis, et al., *Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis*. PNAS, 2007. **104**(49).
112. Florian Röhrig and Almut Schulze, *The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2016.
113. Javier A Menendez and Ruth Lupu, *Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis*. Nature, 2007. **7**.
114. Franziska Baenke, et al., *Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development*. Disease Models & Mechanisms, 2013. **6**: p. 1353-1363.
115. Cong-Hui Yao, et al., *Exogenous Fatty Acids are the Preferred Source of Membrane Lipids in Proliferating Fibroblasts*. Cell Chem Biol., 2016. **23**(4).
116. Francis P Kuhajda, et al., *Fatty acid synthesis A potential selective target for antineoplastic therapy*. Medical Science, 1994. **91**.
117. Sabrina Rossi, et al., *Fatty Acid Synthase Expression Defines Distinct Molecular Signatures in Prostate Cancer*. Molecular Cancer Research, 2003. **1**.
118. Paolo Visca, et al., *Fatty Acid Synthase (FAS) is a Marker of Increased Risk of Recurrence in Lung Carcinoma*. Anticancer Research, 2004. **24**: p. 4169-4174.
119. Payal Kapur, et al., *Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms*. Modern Pathology, 2005. **18**.
120. Tajino Takahiro, Suzuki Toshimitsu, and Kikuchi Shinichi *Expression of Fatty Acid Synthase as a Prognostic Indicator in Soft Tissue Sarcomas*. Clinical Cancer Research, 2003. **9**: p. 2204–2212.
121. Hatzivassiliou, G., et al., *ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth*. Cancer Cell, 2005. **8**(4): p. 311-21.
122. Jinghan Wang, et al., *Low expression of ACLY associates with favorable prognosis in acute myeloid leukemia*. Journal of Translational Medicine, 2019. **17**(149).
123. Toshiro Migita, et al., *ATP Citrate Lyase: Activation and Therapeutic Implications in Non-Small Cell Lung Cancer*. Cancer Research, 2008. **68**(20).
124. Svensson, R.U., et al., *Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models*. Nat Med, 2016. **22**(10): p. 1108-1119.



125. Chajes, V., et al., *Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival*. *Cancer Res*, 2006. **66**(10): p. 5287-94.
126. Scaglia, N. and R.A. Igal, *Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(27): p. 25339-49.
127. Natalia Scaglia and R Ariel Igal, *Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis*. *International Journal Of Oncology*, 2008. **33**.
128. Yan Sun, et al., *SREBP1 regulates tumorigenesis and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism*. *Tumor Biology*, 2015. **36**.
129. Yang-An Wen, et al., *Downregulation of SREBP inhibits tumor growth and initiation by altering cellular metabolism in colon cancer*. *Cell Death and Disease*, 2018. **9**(265).
130. Jisheng Bao, et al., *SREBP-1 is an independent prognostic marker and promotes invasion and migration in breast cancer*. *Oncology Letters*, 2016. **12**.
131. Thomas Porstmann, et al., *SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth*. *Cell Metab*, 2008.
132. Katrin Düvel, et al., *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1*. *Mol Cell*, 2010. **39**(2).
133. Deliang Guo, et al., *EGFR Signaling Through an Akt-SREBP-1-Dependent, Rapamycin-Resistant Pathway Sensitizes Glioblastomas to Anti-Lipogenic Therapy*. *Science Signal*, 2010. **2**(101).
134. Metallo, C.M., et al., *Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia*. *Nature*, 2013. **481**(7381): p. 380–384.
135. Jurre J Kamphorst, et al., *Quantitative analysis of acetyl-CoA production in hypoxic cancer cells reveals substantial contribution from acetate*. *Cancer & Metabolism*, 2014.
136. Kuhajda, F.P., *Fatty Acid Synthase and Cancer: New Application of an Old Pathway*. *Cancer Res*, 2006. **66**(12).
137. T Mashima, H Seimiya, and T Tsuruo, *De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy*. *British Journal of Cancer*, 2009. **100**: p. 1369 – 1372.
138. Demoulin JB, et al., *Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(34): p. 35392–35402.
139. Kuhajda F. P, et al., *Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1994. **91**(14): p. 6379-83.
140. Saitoh S, et al., *Aberrant mitosis in fission yeast mutants defective in fatty acid synthetase and acetyl CoA carboxylase*. *The Journal of Cell Biology*, 1996. **134**(4): p. 949-961
141. Al-Feel W, DeMar JC, and Wakil SJ, *A Saccharomyces cerevisiae mutant strain defective in acetyl-CoA carboxylase arrests at the G2/M phase of the cell cycle*. *PNAS*, 2003. **100**(6): p. 3095–3100.
142. Jurre J Kamphorst, et al., *Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids*. *PNAS*, 2013. **110**(22).

143. Jingchun Wang and Yongsheng Li, *CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions*. *Theranostics*, 2019. **9**(17).
144. Olaf Beckonert, et al., *Visualizing metabolic changes in breast cancer tissue using 1H-NMR spectroscopy and self organizing maps*. *NMR Biomed*, 2003. **16**: p. 1-11.
145. Izabela Dobrzyńska, et al., *Characterization of Human Bladder Cell Membrane During Cancer Transformation*. *J Membrane Biol*, 2015. **248**.
146. Izabela Dobrzyńska, et al., *Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2005. **276**: p. 113–119.
147. Xiaoning Wu, et al., *Lipid Droplets Maintain Energy Homeostasis and Glioblastoma Growth via Autophagic Release of Stored Fatty Acids*. *Science*, 2020.
148. Carolina Bagnato and R Ariel Igal, *Overexpression of Diacylglycerol Acyltransferase-1 Reduces phospholipid Synthesis, Proliferation, and Invasiveness in Simian Virus 40-transformed Human Lung Fibroblasts*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(52): p. 52203–52211.
149. Isabel R. Schlaepfer, et al., *Lipid Catabolism via CPT1 as a Therapeutic Target for Prostate Cancer*. *Mol Cancer Therapeutic*, 2014. **13**(10).
150. Yibao Maa, et al., *Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer*. *Cancer Lett*, 2018.
151. Arkaitz Carracedo, Lewis C Cantley, and Pier Paolo Pandolfi, *Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight*. *Nature Review Cancer*, 2013. **13**(4): p. 227–232.
152. Ohata, T., et al., *Fatty acid-binding protein 5 function in hepatocellular carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition*. *Cancer Med*, 2017. **6**(5): p. 1049-1061.
153. Wu, G., et al., *FABP5 is correlated with poor prognosis and promotes tumour cell growth and metastasis in clear cell renal cell carcinoma*. *Eur J Pharmacol*, 2019. **862**: p. 172637.
154. Wang, W., et al., *FABP5 correlates with poor prognosis and promotes tumor cell growth and metastasis in cervical cancer*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(11): p. 14873-14883.
155. Adamson, J., et al., *High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity*. *Oncogene*, 2003. **22**(18): p. 2739-49.
156. Liu, R.Z., et al., *Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy*. *Am J Pathol*, 2011. **178**(3): p. 997-1008.
157. Catherine A. Powell, et al., *Fatty acid binding protein 5 promotes metastatic potential of triple negative breast cancer cells through enhancing epidermal growth factor receptor stability*. *Oncotarget*, 2015. **6**.
158. Jia-bin Lu, et al., *Altered epidermal fatty acid-binding protein expression in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable outcomes*. *Cancer Management and Research*, 2018. **10**.
159. Elwin A Morgan, et al., *Expression of cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) in prostate cancer: Potential prognostic marker and target for tumourigenicity-suppression*. *International Journal Of Oncology*, 2008. **32**.

160. Coller H A, et al., *Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3260-5.
161. Kannan-Thulasiraman, P., et al., *Fatty acid-binding protein 5 and PPARbeta/delta are critical mediators of epidermal growth factor receptor-induced carcinoma cell growth*. J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19106-15.
162. Koichiro Kawaguchi, et al., *The cancer-promoting gene fatty acid-binding protein 5 (FABP5) is epigenetically regulated during human prostate carcinogenesis*. Biochem J, 2016. **473**.
163. Chun Jing, et al., *Identification of the Messenger RNA for Human Cutaneous Fatty Acid-binding Protein as a Metastasis Inducer*. Cancer Research, 2000. **60**: p. 2390–2398.
164. Guanjie Zhao, et al., *Effect of FABP5 gene silencing on the proliferation, apoptosis and invasion of human gastric SGC-7901 cancer cells*. Oncology Letters, 2016. **14**.
165. Koichiro Kawaguchi, et al., *High expression of Fatty Acid-Binding Protein 5 promotes cell growth and metastatic potential of colorectal cancer cells*. FEBS Open Bio, 2016. **6**.
166. Zhengzheng Bao, et al., *A Novel Cutaneous Fatty Acid–Binding Protein-Related Signaling Pathway Leading to Malignant Progression in Prostate Cancer Cells*. Genes & Cancer, 2013. **4**(7-8).
167. Morgan, E., P. Kannan-Thulasiraman, and N. Noy, *Involvement of Fatty Acid Binding Protein 5 and PPARbeta/delta in Prostate Cancer Cell Growth*. PPAR Res, 2010. **2010**.
168. Thaddeus T Schug, et al., *Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPAR/to RAR*. PNAS, 2008. **105**(21).
169. Thaddeus T Schug, et al., *Dual transcriptional activities underlie opposing effects of retinoic acid on cell survival*. Cell, 2007. **129**(4): p. 723–733.
170. Levi, L., et al., *Genetic ablation of the fatty acid-binding protein FABP5 suppresses HER2-induced mammary tumorigenesis*. Cancer Res, 2013. **73**(15): p. 4770-80.
171. Farzad S Forootan, et al., *The expression of C-FABP and PPARγ and their prognostic significance in prostate cancer*. International Journal Of Oncology, 2014. **44**.
172. Bao, Z., et al., *A novel cutaneous Fatty Acid-binding protein-related signaling pathway leading to malignant progression in prostate cancer cells*. Genes Cancer, 2013. **4**(7-8): p. 297-314.
173. Farzad S Forootan, et al., *Fatty acid activated PPARγ promotes tumorigenicity of prostate cancer cells by up regulating VEGF via PPAR responsive elements of the promoter*. Oncotarget, 2016. **7**.
174. Jieun Seo, et al., *Fatty-acid-induced FABP5/HIF-1 reprograms lipid metabolism and enhances the proliferation of liver cancer cells*. Nature Communications Biology, 2020. **3**(638).
175. Shogo Senga, et al., *A novel fatty acid-binding protein 5-estrogen-related receptor α signaling pathway promotes cell growth and energy metabolism in prostate cancer cells*. Oncotarget, 2018. **9**(60).
176. Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 2010.
177. Ann V. Hertzfel, et al., *Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Fatty Acid Binding Proteins*. J Med Chem, 2009. **52**(19).

178. Waseem Al-Jameel, et al., *Inhibitor SBF126 suppresses the malignant progression of castration-resistant PC3-M cells by competitively binding to oncogenic FABP5*. *Oncotarget*, 2017. **8**(19).
179. E G Bligh and W J Dyer, *A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION*. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959. **37**(8).
180. Deborah M. Muoio, et al., *AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target*. *Biochemical Journal*, 1999. **338**.
181. Barry M. Forman, et al., *15-Deoxy- $\Delta^12$ - $\Delta^14$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR $\gamma$* . *Cell*, 1995. **83**: p. 803-812.
182. Suarez-Arnedo A., et al., *An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays*. *PLoS One*, 2020. **15**(7).
183. Dean D Manning, Norman D Ree, and Charles F Shaffer, *Maintenance of skin xenografts of widely divergent phylogenetic origin on congenitally athymic (nude) mice*. *The Journal Of Experimental Medicine*, 1973. **138**.
184. Michael I Love, Wolfgang Huber, and Simon Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biology*, 2014. **15**: p. 550.
185. Chi-Young Jeong, et al., *Fatty acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in human intrahepatic cholangiocarcinoma*. *Oncology Reports*, 2012. **28**: p. 1283-1292.
186. Fang, L.Y., et al., *Fatty-acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2010. **39**(4): p. 342-8.
187. Chun Jing, et al., *Human Cutaneous Fatty Acid-binding Protein Induces Metastasis by Up-Regulating the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Gene in Rat Rama 37 Model Cells Human Cutaneous Fatty Acid-binding Protein Induces Metastasis by Up-Regulating the Expressi.* . *Cancer Research*, 2001. **61**: p. 4357–4364.
188. S Shaughnessy, et al., *Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice ( $\alpha P2^{-/-}$ ) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte [correction of keratinocyte] fatty acid binding protein*. *Diabetes*, 2000. **49**(6): p. 904–911.
189. Gordon S Lee, et al., *Fatty AcideBinding Protein 5 Mediates the Uptake of Fatty Acids, but not Drugs, Into Human Brain Endothelial Cells*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017.
190. Kewei Ni, et al., *miR-21 promotes non-small cell lung cancer cells growth by regulating fatty acid metabolism*. *Cancer Cell International*, 2019. **19**(219).
191. Zhang, C., et al., *FABP5 promotes lymph node metastasis in cervical cancer by reprogramming fatty acid metabolism*. *Theranostics*, 2020. **10**(15): p. 6561-6580.
192. James Ross Cooper, et al., *Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype*. *PLoS ONE*, 2016.
193. John U Balis, et al., *Synthesis of Lung Surfactant-Associated Glycoproteins by A549 Cells: Description of an in Vitro Model for Human Type II Cell Dysfunction*. *Experimental Lung Research*, 2009. **6**.

194. Florian Guthmann, et al., *Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific lipid metabolism*. Eur. J. Biochem, 1998. **253**: p. 430-436.
195. Sue Yu, et al., *Bovine Pulmonary Surfactant: Chemical Composition and Physical Properties*. Lipids, 1983. **18**(8).
196. Richard King and John Clements, *Surface active materials from dog lung. Composition and physiological correlations*. American Journal of Phisiology, 1972. **223**.
197. Wolfgang Bernhard, et al., *Conductive Airway Surfactant: Surface-tension Function, Biochemical Composition, and Possible Alveolar Origin*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. , 1997. **17**: p. 41–50.
198. M. C. Kahn, et al., *Phosphatidylcholine molecular species of calf lung surfactant*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 1995. **269**(5): p. L567-L573.
199. S A Shelley, et al., *Biochemical Composition of Adult Human Lung Surfactant*. Lung, 1982. **160**: p. 195-206.
200. Schug, T.T., et al., *Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors*. Cell, 2007. **129**(4): p. 723-33.
201. Ligong Chang, et al., *Inhibition of FASN suppresses the malignant biological behavior of non-small cell lung cancer cells via deregulating glucose metabolism and AKT/ERK pathway*. Lipids in Health and Disease, 2019.
202. Kamal Eltayeb, et al., *Reprogramming of Lipid Metabolism in Lung Cancer: An Overview with Focus on EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer*. Cells, 2022. **11**(413).
203. Buhrens, R.I., et al., *Protein expression in human non-small cell lung cancer: a systematic database*. Pathobiology, 2009. **76**(6): p. 277-85.
204. Singh, A., et al., *De novo lipogenesis represents a therapeutic target in mutant Kras non-small cell lung cancer*. FASEB J, 2018: p. fj201800204.
205. Gouw, A.M., et al., *Oncogene KRAS activates fatty acid synthase, resulting in specific ERK and lipid signatures associated with lung adenocarcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(17): p. 4300-4305.
206. Tal M. Lewin, et al., *Acyl-CoA Synthetase Isoforms 1, 4, and 5 Are Present in Different Subcellular Membranes in Rat Liver and Can Be Inhibited Independently*. The Journal Of Biological Chemistry, 2001. **276**(27).
207. Senga, S., et al., *Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) promotes lipolysis of lipid droplets, de novo fatty acid (FA) synthesis and activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) signaling in cancer cells*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2018. **1863**(9): p. 1057-1067.
208. Erol, E., et al., *Liver fatty acid binding protein is required for high rates of hepatic fatty acid oxidation but not for the action of PPARalpha in fasting mice*. FASEB J, 2004. **18**(2): p. 347-9.
209. Lagakos, W.S., et al., *Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(5): p. G803-14.
210. Jing Chen, et al., *CCAT1/FABP5 promotes tumour progression through mediating fatty acid metabolism and stabilizing PI3K/AKT/ mTOR signalling in lung adenocarcinoma*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021. **25**: p. 9199–9213.

211. Peters, J.M., J.E. Foreman, and F.J. Gonzalez, *Dissecting the role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) in colon, breast, and lung carcinogenesis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2011. **30**(3-4): p. 619-40.
212. Daniel Hess, Jeffrey W Chisholm, and R Ariel Igal, *Inhibition of StearoylCoA Desaturase Activity Blocks Cell Cycle Progression and Induces Programmed Cell Death in Lung Cancer Cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(6).
213. Ramanathan S Uma, et al., *Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue is associated with down-regulation of epidermal fatty acid binding protein (E-FABP)*. *Oral Oncology* 2007. **43**: p. 27-32.
214. Yoshito Ohyama, et al., *Differential expression of fatty acid-binding proteins and pathological implications in the progression of tongue carcinoma*. *Molecular And Clinical Oncology*, 2014. **2**: p. 19-25.
215. Rafael Rosell and Niki Karachaliou, *Large-scale screening for somatic mutations in lung cancer*. *The Lancet*, 2016.
216. Rebecca S Heist, Lecia V Sequist, and Jeffrey A Engelman, *Genetic Changes in Squamous Cell Lung Cancer*. *Journal of Thoracic Oncology* 2012. **7**(5).
217. Dorota Anusewicz, Magdalena Orzechowska, and Andrzej K Bednarek, *Lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma differential gene expression regulation through pathways of Notch, Hedgehog, Wnt, and ErbB signalling*. *Scientific Reports*, 2020. **10**.
218. Zhiyuan Tang, et al., *Elevated expression of FABP3 and FABP4 cooperatively correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *Oncotarget*, 2016. **7**(29).
219. Ghayyoumi, M.A., et al., *Serum Levels of Fatty Acid Binding Protein 5 Decreased in Squamous Cell Lung Carcinoma*. *Galen Medical Journal*, 2014. **3**(4): p. 222-7.
220. Watt, M.J., et al., *Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer*. *Science Transl Med*, 2019. **11**(478).

## APÉNDICE 1

Abreviaturas	Tipos de cáncer
LAML	Acute Myeloid Leukemia
ACC	Adrenocortical carcinoma
BLCA	Bladder Urothelial Carcinoma
LGG	Brain Lower Grade Glioma
BRCA	Breast invasive carcinoma
CESC	Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma
CHOL	Cholangiocarcinoma
LCML	Chronic Myelogenous Leukemia
COAD	Colon adenocarcinoma
CNTL	Controls
ESCA	Esophageal carcinoma
FPPP	FFPE Pilot Phase II
GBM	Glioblastoma multiforme
HNSC	Head and Neck squamous cell carcinoma
KICH	Kidney Chromophobe
KIRC	Kidney renal clear cell carcinoma
KIRP	Kidney renal papillary cell carcinoma
LIHC	Liver hepatocellular carcinoma
LUAD	Lung adenocarcinoma
LUSC	Lung squamous cell carcinoma
DLBC	Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma
MESO	Mesothelioma
MISC	Miscellaneous
OV	Ovarian serous cystadenocarcinoma
PAAD	Pancreatic adenocarcinoma
PCPG	Pheochromocytoma and Paraganglioma
PRAD	Prostate adenocarcinoma
READ	Rectum adenocarcinoma
SARC	Sarcoma
SKCM	Skin Cutaneous Melanoma
STAD	Stomach adenocarcinoma
TGCT	Testicular Germ Cell Tumors
THYM	Thymoma
THCA	Thyroid carcinoma
UCS	Uterine Carcinosarcoma
UCEC	Uterine Corpus Endometrial Carcinoma
UVM	Uveal Melanoma