

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MICHELLE AGOSTINI
Cirurgiã-Dentista

**ÁCIDO GRAXO SINTETASE (FAS) É NECESSÁRIA PARA A PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINOMAS ESPINOCELULARES BUCAIS
HUMANOS**

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

PIRACICABA
2003

MICHELLE AGOSTINI
Cirurgiã-dentista

**ÁCIDO GRAXO SINTETASE (FAS) É NECESSÁRIA PARA A PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINMAS ESPINOCELULARES BUCAIS
HUMANOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Edgard Graner
Prof.^a Dr.^a Otávia Luisa S. D. de Caballero
Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida

PIRACICABA
2003

Ficha Catalográfica

Ag75a Agostini, Michelle.
Ácido graxo sintetase (FAS) é necessária para a proliferação de células derivadas de carcinomas espinocelulares bucais humanos. / Michelle Agostini. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
xxii, 145p. : il.

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

1. Biologia molecular. 2. Patologia bucal. 3. Câncer. 4. Ácidos graxos. I. Graner, Edgard. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Luiz Antonio** e **Terezinha**, a quem tudo devo, pelo amor e dedicação, por apoiarem minhas escolhas e possibilitarem a realização de meus sonhos.*

*Ao meu irmão **Luís Fernando**, meu grande amigo e colega de profissão, e a sua namorada **Roberta**, por estarem sempre torcendo por mim.*

*Ao **Ito**, companheiro de todas as horas, todo meu carinho. Minha eterna gratidão por sua incansável ajuda na elaboração deste trabalho e nos momentos que precisei.*

*Ao meu orientador **Professor Edgard Graner**, que sempre soube fazer eu encontrar meu melhor, num trabalho conjunto que foi de grande aprendizado para mim. Registro assim toda minha admiração pela sua paciência, humildade e seriedade profissional. Meu profundo agradecimento.*

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi construída e realizada com o apoio infinito de muitas pessoas e instituições, dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Thales de Mattos Rocha Filho**;

Ao **Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

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

À **Universidade do Planalto Catarinense – UNIPLAC**, pelo apoio contínuo e pela preocupação no investimento e na qualificação de seu corpo docente, possibilitando meu afastamento para a realização do Mestrado, com a concessão da bolsa de estudos CAPES-PICDT;

Em especial, à Reitora da Universidade do Planalto Catarinense, **Profa. Nara Maria Khun Göcks**, à Pró-Reitora de Ensino, **Profa. Denise Maria Souza Mello** e à assessora de programas e projetos **Profa. Izabella Barison Mattos**, pelo incentivo e estímulo;

Aos colegas professores do curso de Odontologia da UNIPLAC, **César Augusto Poletto, Renato Valiati e Lauro Henrique Lins**, pela amizade, apoio e pelos valiosos momentos de convivência acadêmica;

Ao **Prof. Adércio Miguel Domingues** por despertar meu interesse pela Patologia e à **Profa. Dra. Lenita Maria Aver Araújo**, pela grande contribuição em minha formação;

À minha tia **Profa. Dra. Ivete Simionatto**, meu grande exemplo de vida acadêmica;

Às minhas grandes amigas **Eby, Cristine, Caroline, Daniela, Ana Beatriz, Priscila e Cláudia**, pela amizade e companheirismo sempre presentes;

À colega de Mestrado **Michele Pereira**, pela grande amizade que construímos durante este tempo em Piracicaba;

Aos demais amigos e colegas de turma do Mestrado **Dawton, Jorge, Juliana e Sabrina**, pelos momentos de estudo e diversão compartilhados;

À **Juliana Pereira Almeida e Sílvia Maria P. Paes de Almeida**, pela colaboração no laboratório de cultura de células;

À amiga **Karina Gottardelo Zecchin**, pela valiosa contribuição durante os experimentos no laboratório de biologia molecular;

À **Renata de Oliveira Mattos Graner**, pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho;

Aos amigos e colegas da Patologia **Ana Lúcia, Andresa, Ademar, Cláudio, Danyel, Eduardo, Estela, Fábio Pires, Fábio Ornellas, Francisco, Hercílio, Karina Neves, Lucinei, Marcelo, Mônica, Paulo Bonan, Roberto, Sílvia**, pela agradável convivência;

À Sra. **Ana Cristina do Amaral Godoy**, técnica do laboratório de Patologia, pela realização das reações imunocitoquímicas deste trabalho;

Aos demais funcionários do laboratório de Patologia, **Sr. Adriano Luís Martins, Sr. João Carlos Gomes da Silva Júnior, Rosa Maria Fornasier, Cristiane Rizzo e Eli Cristina Gomes Alves**, e a funcionária do Orocentro **Sra. Aparecida Conceição Campion**, pelo auxílio, colaboração e generosidade;

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e compartilharam desta caminhada, que será para sempre um marco em minha vida pessoal e profissional.

“Faça o que pode, com o que tem, onde estiver”.
(Roosevelt)

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. Ácido graxo sintetase (FAS)	12
2.2. FAS e câncer	16
2.3. FAS e CEC bucal	21
2.4. Regulação da expressão gênica da FAS	22
2.5. Inibidores da atividade de FAS	25
2.6. Receptor de andrógeno (RA)	28
2.7. Receptores da família erb-B	30
2.8. Receptores da família erb-B e câncer	32
2.8.1. EGFR	32
2.8.2. c-erb-B2	34
3. OBJETIVOS	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Cultura de células	39
4.2. Proliferação celular	41
4.2.1. Curvas de proliferação	41
4.2.2. Índices mitóticos	42
4.3. Imunocitoquímica	43
4.4. Preparação dos extratos protéicos das células SCC	45
4.5. Separação eletroforética de proteínas e western blotting	46
4.6. Purificação de RNA e RT-PCR	47
4.7. Inibição da atividade de FAS com cerulenina	49
4.8. Tratamento das células com EGF exógeno	49

4.9. Análises Estatísticas	51
5. RESULTADOS	53
5.1. Células	53
5.2. Proliferação celular	56
5.2.1. Curvas de proliferação	56
5.2.2. Índices mitóticos	60
5.2.3. Detecção imunocitoquica de Ki-67 e PCNA nas células SCC	62
5.3. Produção de FAS pelas células SCC	65
5.4. Produção de RA, EGF, EGFR e c-erb-B2 pelas células SCC	69
5.5. Efeito da inibição da atividade de FAS na proliferação das células SCC	76
5.6. Efeito do tratamento com EGF exógeno na produção de FAS e na proliferação das células SCC	78
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÕES	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	121

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CEC - Carcinoma espinocelular

cm² - Centímetros quadrados

DAB - Diaminobenzidina

DEMEM/F-12- “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium/ Ham’s Nutrient Mixture F-12, 1:1”

DMSO - Di-metil sulfóxido

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato

EGF - “Epidermal Growth Factor” - Fator de crescimento epidérmico

EGFR - “Epidermal Growth Factor Receptor” - Receptor do fator de crescimento epidérmico

FAS - “Fatty acid synthase” – Ácido graxo sintetase

FBS - “Fetal Bovine Serum” - Soro fetal bovino

GAPDH - “Gliceraldehyde -3-Phosphate Dehydrogenase” - Gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase

IgG - Imunoglobulina G

kDa - Quilodaltons

M - Molar

mg - Miligramas

ml - Mililitros

mM - Milimolar

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

NEM - N-etil-maleimida

ng - Nanogramas

pb - Pares de bases

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

PCNA - “Proliferating Cell Nuclear Antigen” - Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR – “Polimerase Chain Reaction” – Reação em cadeia da polimerase

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

PMSF - "Phenylmethylsulfonyl fluoride" – Fenilmetilsulfonil fluoreto

RA - Receptor de Andrógeno

RNA -Ácido ribonucléico

rpm - Rotações por minuto

RT-PCR - “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction” - Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa

SCC - “Squamous cell carcinoma”

SCAP - “Cleavage-activating protein”

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

SER - “Sterol Regulatory Element”.-Elemento regulatório de esteróide

SREBP - “Sterol Regulatory Element Binding Protein” - Proteína ligante do elemento regulatório de esteróide

μl - Microlitros

μM - Micromolar

U - Unidade

USP2 - “ubiquitin-specific protease 2” – Protease específica de ubiquitina 2

χ^2 - Teste do Qui-quadrado

A ácido graxo sintetase (FAS) é uma enzima metabólica que participa da síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA. Diversos estudos demonstram que FAS é altamente expressa em vários tipos de cânceres humanos, como os de próstata, mama, ovário, tireóide, esôfago, estômago, bexiga, fígado, pulmão, melanoma, sarcomas de tecidos moles e também carcinoma espinocelular (CEC) bucal. Em alguns destes tumores, sua alta expressão está associada com um pior prognóstico. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de FAS e a expressão de RA, EGF, EGFR e c-erb-B2, moléculas reconhecidamente envolvidas na sua regulação, bem como verificar o efeito da inibição da atividade de FAS em quatro linhagens celulares provenientes de CECs bucais humanos (SCC-4, -9, -15 e -25). Experimentos de RT-PCR, imunocitoquímica e western blotting demonstraram que FAS é produzida em quantidades diferentes pelas quatro linhagens celulares, sendo a maior expressão observada nas linhagens SCC-9 e -25. A expressão de receptor de andrógeno foi muito baixa nas linhagens SCC-4, -9 e -15 e não detectável na SCC-25, enquanto EGFR e c-erb-B2 foram expressos em grandes quantidades pelas quatro linhagens. Reações imunocitoquímicas mostraram que a linhagem SCC-25 produz maior positividade do fator de crescimento EGF do que as outras três linhagens. O tratamento das células SCC com o inibidor específico da atividade da FAS cerulenina, provocou

uma redução significativa da proliferação destas células. Quando expostas a altas concentrações de EGF exógeno, as células das linhagens SCC-9 e -15 apresentaram redução nos níveis de FAS, concomitante com diminuição nos seus índices de proliferação. Os resultados deste estudo indicam que FAS é expressa por linhagens celulares de CECs bucais, sendo sua atividade essencial para a proliferação das mesmas. A expressão desta enzima metabólica nas células SCC é regulada de maneira independente de andrógenos, o que deve ocorrer provavelmente por EGF através dos receptores EGFR ou c-erb-B2.

Fatty acid synthase (FAS) is the metabolic enzyme responsible for the endogenous synthesis of saturated long-chain fatty acids from the precursors acetyl-CoA and malonyl CoA. A growing body of evidence suggests that FAS is over expressed in several human cancers, such as prostate, breast, ovarian, thyroid, esophagus, stomach, bladder, liver, lung, melanoma, soft tissue sarcomas and oral squamous cell carcinoma (SCC). For some of these tumors FAS expression seems to be a potential prognostic marker. The aim of the present study was to describe the pattern of FAS production and the expression of molecules involved in its regulation, such as androgen receptor, epidermal growth factor receptor and c-erb-B2 in four oral SCC cell lines (SCC-4, -9, -15 and -25). RT-PCR, immunocytochemistry and western blotting demonstrated that FAS is differentially expressed by the four oral SCC cell lines, with the highest production in SCC-9 followed by SCC-25. Expression of androgen receptor was low in SCC-4, -9, -15 and undetectable in the SCC-25 cell line, whereas EGFR and c-erb-B2 were expressed in high amounts by the four cell lines. Immunocytochemical reactions showed that SCC-25 produce higher levels of epidermal growth factor (EGF) compared to the other three cell lines. The treatment with the specific inhibitor of FAS activity cerulenin was able to significantly reduce the proliferation of oral SCC cells. When exposed to nanomolar concentrations of exogenous EGF

the cells of SCC-9 and -15 presented a reduction in the FAS protein levels concomitant with a decrease in their proliferation rates. Taken together, this results indicate that FAS is expressed by oral SCC cell lines and is essential for their proliferation. In addition, FAS is synthesized in an apparently androgen-independent fashion and its regulation probably occurs via EGFR or c-erb-B2.

1. INTRODUÇÃO

A ácido graxo sintetase (FAS) é a principal enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa (KUHAJDA *et al.*, 2000; PIZER *et al.*, 2000; BARON *et al.*, 2003). Em células normais, com exceção de tecidos altamente lipogênicos como fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação e endométrio na fase proliferativa, a atividade da FAS é mínima, pois a maior parte dos ácidos graxos utilizados são provenientes da dieta (WEISS, 1986; KUHAJDA, 2000).

Vários estudos recentes têm mostrado que níveis elevados de FAS são encontrados em diversos tipos de neoplasias malignas de natureza epitelial, como as de mama (PIZER *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2001), próstata (EPSTEIN *et al.*, 1995; SWINNEN *et al.*, 2000; ROSSI *et al.*, 2003), ovário (ALO *et al.*, 2000), estômago (KUSAKABE *et al.*, 2002), bexiga (VISCA *et al.*, 2003), o melanoma (INNOCENZI *et al.*, 2003) e os carcinomas espinocelulares bucais (CECs) (KRONTRIRAS *et al.*, 1999) assim como em sarcomas de tecidos moles (TAKAHIRO *et al.*, 2003). Em alguns destes tumores a alta expressão desta enzima está associada com um pior prognóstico para o paciente (ALO *et al.*, 1996; GANSLER *et al.*, 1997; VISCA *et al.*, 1999; ALO *et al.*, 2000; INNOCENZI *et al.*, 2003).

A expressão de FAS é estimulada por progesterona em linhagens celulares derivadas de câncer de mama (LACASA *et al.*, 2001), enquanto que andrógenos e EGF aumentam tanto a expressão como a atividade de FAS em

células de câncer de próstata (SWINNEN *et al.*, 1997; SWINNEN *et al.*, 2000; HEEMERS *et al.*, 2001; VAN DE SANDE *et al.*, 2002). No entanto, níveis elevados de FAS também são encontrados em tumores de próstata independentes de andrógeno (PIZER *et al.*, 2001; MYERS *et al.*, 2001). KUMAR-SINHA *et al.* (2003) demonstraram, através de análise de expressão gênica em larga escala (“microarrays”) que o gene da FAS é um dos genes regulados pelo oncogene c-erb-B2, após expressão forçada deste último em células de câncer de mama.

Quando tratadas com inibidores específicos da atividade da FAS (cerulenina ou c75), células de câncer de próstata, mama e colon apresentam, além da diminuição na síntese de ácidos graxos, bloqueio na replicação do DNA, diminuição da proliferação celular e aumento do número de células em apoptose. (FURUYA *et al.*, 1997; PIZER *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2001). Amostras teciduais de CECs bucais quando tratadas com cerulenina também apresentam diminuição da síntese de ácidos graxos (GUO *et al.*, 2003).

A conexão entre a biossíntese de lipídios e o controle do ciclo celular ainda não é conhecida. Entretanto, SWINNEN *et al.* (2003) demonstraram que a expressão e atividade de FAS são necessárias para a produção de fosfolipídios da membrana celular em células de câncer de próstata, o que sugere que FAS tenha um papel essencial na síntese das membranas celulares de células tumorais.

Como a atividade biológica da FAS está restrita a síntese de ácidos graxos, processo aparentemente acelerado em células tumorais, esta é vista como um possível alvo terapêutico para o tratamento de diversos tipos de câncer (KUHAJDA, 2000; SWINNEN *et al.*, 2000; GABRIELSON *et al.*, 2001; KUMAR-

SINHA *et al.*, 2003). No presente trabalho a produção e a atividade de FAS são estudadas em quatro linhagens celulares de CEC bucal e correlacionadas com o potencial proliferativo de cada uma delas. A expressão de receptor de andrógeno, EGF, EGFR e c-erb-B2, moléculas reconhecidamente envolvidas na regulação dos níveis da proteína FAS também é descrita neste modelo experimental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O CEC da cavidade bucal é o sexto tipo de neoplasia mais comum no mundo (NAGPAL & DAS, 2003). De acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2003, o CEC de boca representará o oitavo tipo de tumor mais comum em incidência entre os homens e o nono entre as mulheres.

Consumo de tabaco e de álcool são os fatores de risco mais importantes associados ao desenvolvimento do CEC da cavidade bucal e faringe (JOHNSON, 2001; WÜNSCH-FILHO, 2002; MANSOUR *et al.* 2003). Estas neoplasias se caracterizam por invasão local, sendo que metástases desenvolvem-se mais freqüentemente nos linfonodos cervicais (NEVILLE & DAY, 2002). O prognóstico é geralmente ruim, muitas vezes devido ao diagnóstico tardio da doença (ONIZAWA *et al.* 2003). A taxa de sobrevida de cinco anos para os pacientes portadores de CEC bucal está entre as mais baixas, quando comparadas com as de outras neoplasias malignas (MARGOTTA & CAPOGRECO, 2003), permanecendo inalterada durante as duas últimas décadas, mesmo com os progressos nos métodos terapêuticos e de diagnóstico que vem ocorrendo na oncologia clínica (CONWAY *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2003).

Esta revisão da literatura tem como objetivo descrever a enzima anabólica FAS e seu papel na patogênese das neoplasias malignas, em particular do CEC bucal. São abordados também os mecanismos de regulação da expressão de FAS em diferentes modelos biológicos, destacando-se o papel dos

receptores da família erb-B e do receptor de andrógeno, além das conseqüências da inibição de sua atividade sobre as células neoplásicas.

2.1. Ácido graxo sintetase (FAS)

A ácido graxo sintetase (“Fatty Acid Synthase” – FAS ou EC.2.3.1.85) é a enzima metabólica responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA (STOOPS & WAKIL, 1981; JAYAKUMAR *et al.*, 1995; CHIRALA *et al.*, 2001; KUHAJDA, 2000; BRINK *et al.*, 2001, BARON *et al.*, 2003). Os ácidos graxos e seus derivados participam da composição das membranas celulares (NELSON & COX, 2000; CHIRALA *et al.*, 2003) e atuam como hormônios e mensageiros intracelulares, além de serem uma das principais formas de armazenamento de energia no organismo (KUMAR-SINHA *et al.*, 2003).

FAS é pouco expressa ou mesmo não expressa na maioria dos tecidos humanos normais, pois nestes a maior parte dos ácidos graxos utilizados pelas células é proveniente da dieta (WEISS, 1986; KUHAJDA, 2000, KUHAJDA *et al.*, 2000). Porém, em tecidos altamente lipogênicos como o fígado, o tecido adiposo e a mama durante os períodos de lactação, a síntese endógena de ácidos graxos é importante para o armazenamento de energia na presença de uma dieta rica em carboidratos, para a produção de ácidos graxos a partir de carboidratos ou proteínas se a dieta é pobre em gordura e para a síntese dos lipídios que compõe o leite (KUHAJDA, 2000; BRINK *et al.*, 2001; CHIRALA *et al.*, 2003). FAS também

é expressa nas glândulas endometriais durante a fase proliferativa do ciclo menstrual, a qual está associada à expressão do marcador de proliferação Ki-67 e dos receptores de estrógeno e progesterona (KUHAJDA, 2000).

Apesar de seu papel aparentemente marginal em células normais, a recente construção de camundongos “knockout” para o gene que codifica FAS (*FASN*) sugere o contrário. Os camundongos mutantes homozigotos nulos para FAS (*FASN* $-/-$) morreram no estágio de pré-implantação e a maioria dos heterozigotos (*FASN* $+/-$) morreram no útero, mesmo na presença de uma dieta rica em ácidos graxos saturados (CHIRALA *et al.*, 2003). Estes resultados salientam a importância da atividade de FAS nas células em proliferação e levantam a possibilidade das drogas com ação inibitória específica sobre FAS possuírem potencial teratogênico.

Embora vinte e cinco enzimas estejam envolvidas na produção de ácidos graxos a partir da glicose, a via principal é composta pelos seguintes elementos: 1- acetil-CoA carboxilase, enzima que sintetiza malonil-CoA, cuja atividade é um ponto regulatório essencial na síntese de ácidos graxos; 2-citrato liase, que sintetiza acetil-CoA; 3- enzima málica e a via da pentose fosfato, que produzem quantidades iguais de NADPH, molécula usada como agente redutor na síntese de ácidos graxos; e 4- FAS, a enzima que catalisa a reação de condensação de malonil-CoA e acetil-CoA, num processo dependente de NADPH, cujo principal produto final é o ácido graxo saturado livre de 16 carbonos palmitato (KUHAJDA, 2000; PIZER *et al.*, 2000).

Do ponto de vista estrutural, a FAS é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas longas, com massa molecular de aproximadamente 250 kDa (Figura I). Em cada cadeia existem sete sítios catalíticos distintos e um sítio para a proteína carregadora de acil (ACP) (STOOPS & WAKIL, 1981; WAKIL 1989; KUHAJDA, 2000; BRINK *et al.*, 2001; CHIRALA *et al.*, 2001; CHIRALA *et al.*, 2003). Estes sítios catalíticos estão distribuídos a partir da extremidade amino terminal em direção a carboxil terminal na seguinte ordem: β -cetoacil sintetase, acetil-CoA e malonil-CoA transacilases (Domínio I), desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase, proteína carregadora de acil (Domínio II) e tioesterase (Domínio III) (JAYAKUMAR *et al.*, 1995, WAKIL, 1989). O domínio I funciona como um sítio de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para a subsequente reação de condensação. O domínio II é o redutor, no qual o produto formado pela β -cetoacil sintetase, através da elongação da cadeia, é reduzido pelas enzimas componentes deste domínio, enquanto que no domínio III, na região carboxil terminal, a enzima tioesterase, promove a hidrólise, sendo a molécula de ácido graxo recém sintetizada liberada (WAKIL, 1989).

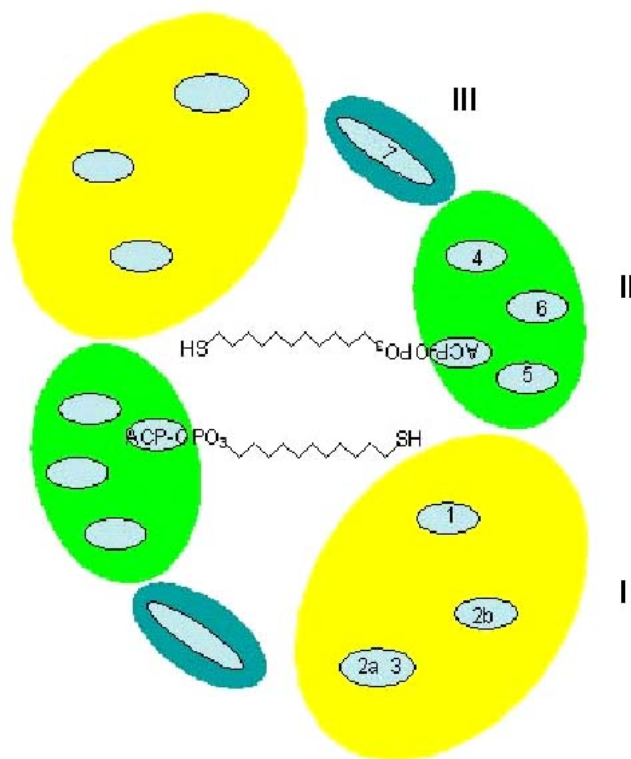


Figura I – Representação esquemática do homodímero formado por duas cadeias de FAS. Domínio I – (1) acetil-CoA transacilase, (2b) malonil-CoA transacilase, (2a,3) β -cetoacil sintetase; Domínio II – (4) β -cetoacil redutase, ACP, (5) desidratase, (6) enoil redutase; Domínio III – (7) tioesterase.

Apesar do palmitato ser o seu principal produto (Figura II), a FAS também catalisa a síntese dos ácidos graxos saturados miristato e estereato, também a partir dos substratos acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH (CHIRALA *et al.*, 2003). A tioesterase apresenta níveis maiores de hidrólise com palmitoil-CoA, mas é também ativa com esteroil-CoA e em menor extensão com miristoil-CoA, refletindo a produção destes ácidos graxos pela FAS (WAKIL, 1989).

Além de serem constituintes de vários lipídios de membrana, os produtos da FAS miristato (C14) e palmitato (C16) estão envolvidos na miristilação e palmitilação de proteínas celulares e virais (CHIRALA *et al.*, 2003). Palmitato e o estereato (C18) servem como substratos para produzir ácidos graxos de cadeias muito longas (NELSON & COX, 2000; CHIRALA *et al.*, 2003), constituintes importantes dos esfingolipídios, ceramidas e glicolipídios necessários para a progressão da divisão celular, formação de estruturas cerebrais e funções neurológicas (CHIRALA *et al.* 2003).

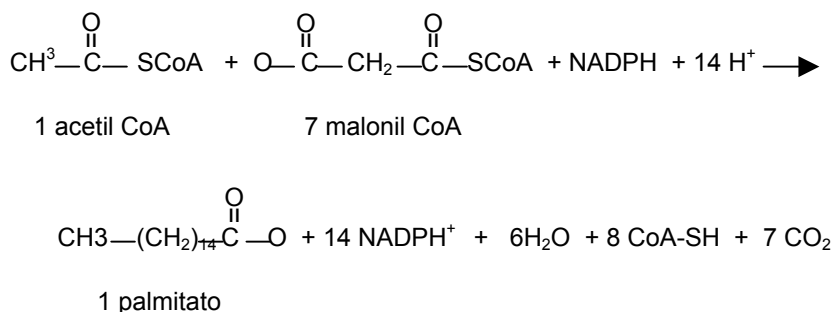


Figura II- Reação da síntese de palmitato pela FAS. Inicialmente uma molécula de acetil-CoA é condensada com uma de malonil-CoA. A seguir seis moléculas adicionais de malonil-CoA são condensadas para a elongação da cadeia e produção do palmitato. Água, dióxido de carbono e íons positivos de NADPH são também produtos da reação.

2.2. FAS e câncer

Em 1953, MEDES *et al.* relataram pela primeira vez que a síntese de ácidos graxos está aumentada nos tecidos tumorais. De fato, nas células malignas, a maior parte dos ácidos graxos é proveniente da biossíntese

endógena, independentemente do suplemento nutricional (SABINE & ABRAHAM, 1967; OOKHTENS *et al.*, 1984; WEISS *et al.*, 1986). Tumores que expressam quantidades anormalmente altas de FAS exibem comportamento biológico mais agressivo, provavelmente porque a alta expressão e atividade desta enzima geram vantagens seletivas para o crescimento celular (BARON *et al.*, 2003).

FAS está presente em grandes quantidades em diversos tipos de neoplasias malignas humanas de natureza epitelial, como as de mama (PIZER *et al.*, 1996a; MILGRAUM *et al.*, 1997; OSKOUIAN, 2000; WANG *et al.*, 2001), ovário (PIZER *et al.*, 1996b; ALO *et al.*, 2000), próstata (EPSTEIN *et al.*, 1995, SHURBAJI *et al.*, 1996; SWINNEN *et al.*, 1997a; SWINNEN *et al.*, 2000; BULL *et al.*, 2001; DHANASEKARAN *et al.* 2001; WELSH *et al.*, 2001; SWINNEN *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2003), endométrio (PIZER *et al.*, 1998a), tireóide (VLAD *et al.*, 1999), pulmão (PIYATHILAKE *et al.*, 2000), colon (RASHID *et al.*, 1997; VISCA *et al.*, 1999), esôfago (NEMOTO *et al.*, 2001), estômago (KUSAKABE *et al.*, 2002), melanoma (INNOCENZI *et al.*, 2003), bexiga (VISCA *et al.*, 2003) e CEC oral (KRONTIRAS *et al.*; 1999). Além do mais, alta expressão de FAS foi recentemente demonstrada em sarcomas de tecidos moles (TAKAHIRO *et al.*, 2003).

Numerosos relatos têm demonstrado uma associação positiva entre expressão de FAS e o comportamento clínico agressivo dos tumores (KUHAJDA, 2000). Por exemplo, em neoplasias de próstata (EPSTEIN *et al.*, 1995), de mama (ALO *et al.*, 1996), de ovário (GANSLER *et al.*, 1997; ALO *et al.*, 2000), de tireóide (VLAD *et al.*, 1999), de colon (VISCA *et al.*, 1999), melanomas (INNOCENZI *et al.*, 2003) e sarcomas de tecidos moles (TAKAHIRO *et al.*, 2003) uma alta expressão

de FAS ocorre preferencialmente nos casos com pior prognóstico. Um achado bastante interessante é a alta expressão de FAS também em carcinomas *in situ*, como por exemplo carcinomas ductais e lobulares de mama *in situ*, bem como lesões precursoras dos tumores invasivos de colon (KUHAJDA, 2000). Num estudo recente realizado através da tecnologia dos “microarrays”, RAMASWAMY et al. (2003) descreveram um padrão particular de expressão gênica em tumores sólidos metastáticos originários de mama, próstata, pulmão, colon, útero e ovário. Dentre os 64 genes com alta expressão nas metástases encontrados por estes autores estava a FAS, sugerindo um papel para esta proteína no processo metastático.

FAS é expressa em quase todos os carcinomas esofagianos e também nas lesões displásicas, o que sugere que ela possa ter sua expressão aumentada de maneira contínua desde os estágios mais precoces da transformação maligna das células escamosas do esôfago (NEMOTO *et al.*, 2001). Alta expressão de FAS é também um evento precoce no desenvolvimento e na progressão de carcinomas espinocelulares de pulmão (PIYTHILAKE *et al.*, 2000). KUSAKABE *et al.* (2002) relataram que FAS é também altamente expressa em carcinomas e adenomas, assim como no epitélio regenerativo e metaplasia do estômago (metaplasia intestinal). Segundo estes autores, esta expressão ocorre nos estágios precoces da tumorigênese e parece desempenhar um papel mais importante durante o desenvolvimento de áreas pré-cancerosas do que na progressão tumoral.

Amostras de carcinomas de colon apresentam síntese de ácidos graxos aumentada, além de expressar altos níveis de FAS através de imunohistoquímica, quando comparadas com a mucosa normal adjacente (VISCA *et al.* 1999). A expressão de FAS está aparentemente relacionada com a fase tardia da carcinogênese de colon, havendo correlação positiva com estágio pT, presença de metástases em linfonodos e tipo histológico mais agressivo, entretanto não pode ser considerada como um fator prognóstico independente para a sobrevida global (VISCA *et al.*, 1999).

Níveis aumentados da proteína FAS estão positivamente associados com adenocarcinomas prostáticos de alto grau em estágios avançados, sugerindo que a alta produção desta enzima é indicativa de agressividade (EPSTEIN *et al.*, 1995; MYERS *et al.*, 2001) e pior prognóstico (OSKOUIAN, 2000). Segundo SWINNEN *et al.* (2002), elevada expressão de FAS é um dos eventos precoces mais comuns no desenvolvimento de câncer de próstata. ROSSI *et al.* (2003) demonstraram níveis mais altos de RNAs mensageiros e da proteína FAS em amostras de carcinomas de próstata, em comparação com o tecido normal adjacente, num estudo utilizando “microarrays de oligonucleotídeos e de tecidos”. Os mesmos autores encontraram uma forte associação entre a expressão de FAS e a iniciação e progressão dos tumores de próstata, além de descrever uma elevada expressão da enzima em metástases ósseas independentes de andrógeno. Em um modelo experimental de transplantes xenográficos de adenocarcinomas de próstata em camundongos, MYERS *et al.* (2002) observaram que um dos eventos precoces na progressão do tumor na ausência de

andrógenos (por castração) é o aparecimento de pequenos focos de células em proliferação expressando níveis baixos de p27Kip-1 e altos de FAS. Segundo estes autores, o fenômeno de proliferação celular independente de andrógenos, comumente observado nas lesões avançadas de próstata, é favorecido pela alta atividade de FAS. No mesmo contexto, PIZER *et al.*, (2001), sugerem que a expressão de FAS e a conseqüente síntese de ácidos graxos são importantes para o fenótipo maligno no câncer de próstata, talvez sustentando o crescimento e sobrevivência do tumor na ausência de andrógeno.

Apesar de todas estas evidências sugerindo que a síntese endógena de ácidos graxos seja um processo essencial para a sobrevivência e proliferação das células neoplásicas, não se conhece até o presente momento qual o mecanismo biológico envolvido. Como será descrito adiante, a atividade de FAS está de alguma maneira ligada à progressão do ciclo celular das células tumorais. Uma síntese adicional de ácidos graxos parece ser requerida para a biogênese das membranas celulares de células tumorais em rápida divisão, pois ácidos graxos de cadeias muito longas, gerados a partir dos precursores estereato e palmitato (gerados pela FAS) são requeridos para a divisão celular (HANNUN & OBEID, 2002). Além do mais, o aumento, tanto na expressão como na atividade enzimática da FAS, é necessário para a produção de fosfolipídios da membrana em linhagens celulares de câncer de próstata dependentes de andrógeno (LNCaP) (SWINNEN *et al.*, 2003). De acordo com BARON *et al.* (2003) as alterações que podem ocorrer na composição lipídica das membranas celulares

como resultado da expressão elevada de FAS podem ter efeitos profundos em muitos processos celulares, como as vias de transdução de sinal.

Portanto, considerando os dados descritos acima, as diferenças na expressão de FAS existente entre as células normais e as neoplásicas a tornam um alvo terapêutico em potencial para vários tipos de câncer (KUHAJDA, 2000; SWINNEN *et al.*, 2000; KUMAR-SINHA *et al.*, 2003).

2.3. FAS e CEC bucal

Existem poucas publicações sobre FAS em CEC bucal. A primeira foi feita por Krontiras *et al.* em 1999, que estudaram a expressão de FAS através de imunohistoquímica em cinquenta e seis amostras de CECs de língua humanos. Segundo estes autores, a expressão de FAS foi detectada em 98% das amostras avaliadas, sendo baixa no epitélio morfológicamente normal adjacente ao tumor, aumentando nas áreas de epitélio displásico e tornando-se alta nos tumores. Comparando-se os tumores de acordo com o grau de diferenciação celular, a positividade para FAS foi maior nas lesões bem diferenciadas. Portanto, neste estudo, a expressão de FAS não foi correlacionada com um pior prognóstico, pois tumores bem diferenciados caracteristicamente possuem melhor prognóstico. Uma expressão menor da enzima foi detectada em tumores invasivos, indiferenciados, mas o número de casos analisados foi pequeno para uma conclusão final.

A síntese endógena de ácidos graxos em amostras de CECs bucais, tecidos adjacentes ao tumor e mucosa oral normal foi avaliada por Guo *et al.*

(2000). Estes autores demonstraram através da incorporação de ^{14}C nos lipídios totais sintetizados pelas amostras teciduais, que os CECs produziram significativamente mais ácidos graxos do que os outros tecidos. Em um trabalho subsequente (GUO *et al.*, 2003), os mesmos autores mostraram que esta síntese é inibida pela incubação com o inibidor natural da atividade de FAS, cerulenina. Um achado importante deste estudo foi o fato da cerulenina apresentar pouca atividade inibitória sobre a síntese de ácidos graxos nas amostras de tecido normal. Estudos em andamento no Laboratório de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP têm demonstrado que FAS é expressa em maior quantidade nas lesões de CEC de cabeça e pescoço do que no epitélio normal adjacente, sendo esta positividade maior nos tumores bem diferenciados, como descrito por KRONTIRAS *et al.* (1999) (SILVA *et al.*, 2003).

2.4. Regulação da expressão gênica da FAS

A regulação da expressão de FAS em tecidos normais é complexa e incompletamente entendida. Uma lista de substâncias nutricionais e hormonais que influenciam a expressão de FAS tem sido descrita, as quais podem eventualmente ter impacto na sua expressão em neoplasias malignas. No fígado normal, a atividade da FAS é estimulada pela ingestão de carboidratos, pelo hormônio tireoideano (T3), por insulina, pela proteína spot 14 (proteína de 17 kDa expressa em tecidos lipogênicos que tem um papel importante na estimulação da lipogênese pelo hormônio tireoideano) e por glicocorticóides, sendo inibida por

ácidos graxos poli-insaturados, AMP cíclico e glucagon (KUHADJA *et al.*, 2000). Variações cíclicas normais na expressão de FAS no endométrio sugerem sua regulação por estrógeno e progesterona (PIZER *et al.*, 1999).

Embora muito pouco seja conhecido sobre os mecanismos básicos envolvidos no aumento da expressão da FAS em células malignas, estudos recentes revelaram que FAS é estimulada através do aumento da quantidade de seus RNAs mensageiros, em conjunto com várias outras enzimas da mesma via metabólica (MILGRAUM *et al.*, 1997; SWINNEN *et al.*, 2000).

Em tumores sensíveis a hormônios, estrógeno, progesterona e andrógenos desempenham um papel claro na regulação da FAS (KUHAJDA, 2000). Está demonstrado que progesterona estimula a expressão de FAS em linhagens celulares de câncer de mama (LACASA *et al.*, 2001), enquanto andrógenos e EGF aumentam a expressão e a atividade de FAS em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata (LNCaP) (SWINNEN *et al.*, 1997; SWINNEN *et al.*, 2000; MYERS *et al.*, 2001; HEEMERS *et al.*, 2001; VAN DE SANDE *et al.*, 2002). Tanto a testosterona como o EGF são capazes de estimular a expressão gênica de FAS nestas células através das proteínas SREBPs (SWINNEN *et al.*, 1997b; SWINNEN *et al.*, 2000; HEEMERS *et al.*, 2001).

As SREBPs formam uma família de fatores de transcrição que foram identificados como envolvidos na manutenção da homeostase do colesterol intracelular, no controle da síntese de ácidos graxos e na diferenciação de adipócitos (BRIGGS *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1993). SREBPs são sintetizadas como precursores inativos de 125 kDa, ancorados na parte interna das

membranas celulares, onde formam um complexo com a proteína ativadora de clivagem (SCAP). Sob estímulo androgênico, o complexo SREBP/SCAP é translocado para o complexo de Golgi, onde um fragmento amino terminal de 68 kDa do SREBP é liberado por proteólise e migra para o núcleo estimulando a transcrição de genes que contém em suas regiões regulatórias os elementos SER. Como exemplo de genes ativados por esta via estão aqueles que participam das duas maiores vias lipogênicas, a dos ácidos graxos e da síntese de colesterol (BROWN & GOLDSTEIN, 1997; BROWN & GOLDSTEIN, 1999, HEEMERS *et al.*, 2003).

A expressão forçada do oncogene c-erb-B2 em células de câncer de próstata andrógeno-dependentes ativa o receptor de andrógeno e confere um crescimento andrógeno-independente a estas células (CRAFT *et al.*, 1999). De acordo com estes achados, foi mostrado que a expressão de c-erb-B2 em amostras teciduais de câncer de próstata aumenta em tumores andrógeno-independentes (SIGNORETTI *et al.*, 2000). Este fato está de acordo com o trabalho de ROSSI *et al.* (2003) evidenciando alta produção de FAS nas metástases deste tipo. Usando “microarrays” de DNA, KUMAR-SINHA *et al.* (2003) identificaram um grupo de genes que são diferencialmente regulados por c-erb-B2, através da indução forçada de sua expressão em células de câncer de mama. Um dos genes descobertos como sendo regulado pelo c-erb-B2 é o que codifica a FAS e segundo estes autores, a inibição da atividade da FAS com c75 causa apoptose preferencialmente nas células que estão expressando c-erb-B2 em grandes quantidades. Este trabalho mostra, pela primeira vez, uma conexão

entre a via de sinalização do c-erb-B2 e FAS, sendo esta mediada pela via PI-3K através de um efeito direto no promotor da FAS. A freqüente perda de função do gene supressor de tumor PTEN pode ativar a via PI-3K/Akt e desempenhar um papel importante na regulação de FAS em células neoplásicas (VAN DE SANDE *et al.*, 2002). Portanto, o efeito oncogênico da ativação da via PI-3K pode ser mediado, ao menos em parte, pela indução da expressão de FAS (BARON *et al.*, 2003).

2.5. Inibidores da atividade de FAS

Dentre todas as enzimas lipogênicas, a atividade de FAS está restrita à síntese de ácidos graxos e está presente preferencialmente em tecidos lipogênicos e células tumorais, o que a torna um alvo terapêutico em potencial (KUHAJDA, 2000; KUHAJDA *et al.*, 2000; GABRIELSON *et al.*, 2001).

LOFTUS *et al.* (2000) demonstraram que o tratamento sistêmico com inibidores da atividade de FAS (cerulenina e c75) em camundongos provocam uma redução da quantidade de alimento ingerida e perda significativa de peso nos animais. Segundo KUMAR *et al.* (2001), uma única dose de c75 causa rápida (>90%) diminuição da quantidade de alimento ingerido por camundongos. Estes trabalhos sugerem que a atividade de FAS possa ser importante na regulação da quantidade de alimento ingerido, podendo representar um alvo terapêutico no tratamento da obesidade.

A cerulenina é um produto natural do fungo “*cefalosporium caerulens*”. Cerulenina ou (2*R*, 3*S*) –2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 *trans*, *trans*dodecadienamida é conhecida desde 1960 como sendo um inibidor específico da síntese de ácidos graxos de amplo espectro filogenético (PIZER *et al.*, 1998b, GUO *et al.*, 2003). Esta droga inibe irreversivelmente a atividade da enzima FAS através de sua ligação covalente no sítio da β -cetoacil sintetase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (PIZER *et al.*, 1998b; KUHAJDA *et al.*, 2000; GUO *et al.*, 2003). c75 é uma pequena molécula sintética com cadeia de 7 carbonos (α -metileno- γ -butirolactona), que possui efeitos inibitórios sobre a atividade de FAS comparáveis aos da cerulenina, sendo mais estável do que esta e apresentando portanto melhor efeito “*in vivo*” (KUHAJDA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001).

Tanto a cerulenina como c75 produzem uma rápida e significativa inibição da replicação do DNA e, conseqüentemente, da progressão da fase S em células derivadas de neoplasias malignas humanas (FURUYA *et al.*, 1997; PIZER *et al.*, 1996; PIZER *et al.*, 1998b; KUHAJDA, 2000; LI *et al.*, 2001; DE SCHRIJVER *et al.*, 2003), o que culmina com a morte por apoptose (LI *et al.*, 2001). Após a exposição de células derivadas de carcinoma de colon (HCT116) a cerulenina, PIZER *et al.* (1998b) demonstraram, através da incorporação de timidina tritiada, que ocorreu profunda inibição da replicação do DNA duas horas após o início do tratamento. Os mesmos autores utilizaram células derivadas de leucemia pró-mielocítica (HL 60) para verificar em quanto tempo a síntese de ácidos graxos e a

síntese de DNA seriam inibidas pela cerulenina e pelo c75, através de incorporação de ^{14}C e de timidina tritiada. A inibição da síntese de ácidos graxos foi muito rápida, ocorrendo entre 15 e 30 minutos após exposição às duas drogas ao passo que a inibição máxima da síntese de DNA ocorreu 60 minutos após a exposição ao c75 e 90 minutos após a exposição a cerulenina.

O tratamento com inibidores de FAS causa também a diminuição do tamanho de tumores em modelos xenográficos (PIZER *et al.* 1996b). Neste trabalho os autores relataram uma marcante redução da síntese de ácidos graxos pelas células tumorais e regressão das lesões provocadas em camundongos pela injeção de células de uma linhagem de câncer de ovário (OVCAR-3), o que aumentou significativamente a sobrevida dos animais. De maneira semelhante, células derivadas de câncer de mama (MCF-7) implantadas no tecido subcutâneo de camundongos apresentaram inibição da síntese de ácidos graxos, apoptose e diminuição do tamanho dos tumores formados após o tratamento com c75 (PIZER *et al.* 2000). Estes resultados sugerem uma ligação bioquímica entre FAS e a proliferação celular no câncer (PIZER *et al.*, 1998b; PIZER *et al.*, 2000).

O meio pelo qual a inibição da FAS desencadeia a apoptose ainda não está claro, embora alguns mecanismos tenham sido descritos. O acúmulo de malonil-CoA após o tratamento com cerulenina ou C75 pode mediar, ao menos em parte, a citotoxicidade resultante da inibição da FAS através da inibição da oxidação de ácidos graxos (PIZER *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001; THUPARI *et al.*, 2001; DE SCHRIJVER *et al.*, 2003; KUMAR-SINHA *et al.*, 2003). Segundo PIZER *et al.* (1998b), o mecanismo provavelmente não envolve um efeito direto da droga

na molécula de DNA ou na maquinaria de replicação. Segundo este trabalho, a inibição provavelmente ocorre na regulação do ciclo celular e pode envolver a função de p53. De fato, a perturbação da síntese de ácidos graxos pertence à lista de respostas metabólicas que regulam p53 (LI *et al.*, 2000). Entretanto, HEILIGTAG *et al.* (2002) demonstraram que a resposta apoptótica a cerulenina é mediada pela alta expressão de Bax (pró-apoptótico), a qual ocorre de uma maneira independente de p53.

GUO *et al.* (2003) avaliaram os efeitos da cerulenina na síntese endógena de ácidos graxos em amostras teciduais frescas de CECs bucais e mucosa bucal normal. As amostras foram expostas a meio de cultura contendo 10 µg/ml de cerulenina, pelos períodos de 0, 1, 2 e 4 horas e expostas a ¹⁴C. Neste modelo experimental houve 87% de inibição da síntese de ácidos graxos após o período de quatro horas. A síntese de ácidos graxos da mucosa oral normal também foi inibida pela cerulenina, mas num grau bem menor do que as amostras de CEC.

2.6. Receptor de andrógeno (RA)

Os andrógenos, testosterona e seu metabólito ativo 5α-di-hidrotestosterona (DHT), desempenham um papel chave no desenvolvimento e nas funções dos órgãos reprodutores masculinos, como a próstata e o epidídimo, assim como em tecido muscular, folículos pilosos e cérebro (LEE & CHANG,

2003). A ação dos andrógenos é mediada pelo RA, o qual é um fator de transcrição nuclear ativado pelo seu ligante (O'MALLEY, 1990; TRUSS & BEATO, 1993). Anormalidades nas vias de sinalização através do RA têm sido relacionadas com infertilidade masculina e com o desenvolvimento de câncer de próstata (LEE & CHANG, 2003). Por exemplo, quase todos os carcinomas prostáticos primários expressam a proteína RA (HOBISCH *et al.*, 1995).

Após a ligação do hormônio, o RA se liga aos elementos responsivos a andrógeno localizados nas regiões promotoras dos genes alvo, regulando então a sua expressão (QUIGLEY *et al.*, 1995; KOKONTIS & LIAO, 1998). O mecanismo pelo qual o RA ativa a transcrição gênica ocorre através do recrutamento dos chamados co-ativadores que “ligam” o RA ao complexo de pré-iniciação da transcrição e a RNA polimerase II (JENSTER, 1998; McKENNA *et al.*, 1999).

A regulação transcricional da enzima FAS através de andrógenos, em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata, ocorre pela estimulação da expressão do fator de transcrição SREBP, cuja forma ativa por sua vez estimula as regiões regulatórias do gene da FAS (SWINNEN *et al.*, 1997; SWINNEN *et al.*, 2000; HEEMERS *et al.*, 2001). Além da FAS, a testosterona causa um aumento coordenado da expressão de outros genes lipogênicos, como o gene que codifica a Acetil-CoA carboxilase, também envolvida na síntese de ácidos graxos, e HMG-CoA-redutase e farnesil difosfato sintetase, enzimas que participam da síntese do colesterol (HEEMERS *et al.*, 2003).

Com relação à expressão de RA em neoplasias bucais, a literatura é escassa e controversa. Por exemplo, BASSALYK *et al.* (1987) demonstraram a

expressão de RA em leucoplasias e CECs bucais, sendo mais intensa nos últimos. Por outro lado, NEHSE & TUNN (1994) encontraram níveis mais baixos de RA em amostras de CECs de assoalho bucal e língua do que na mucosa bucal normal. Um estudo em andamento no laboratório de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP não conseguiu, através de reações imunohistoquímicas, detectar a proteína receptora de andrógeno em amostras de CECs de cabeça e pescoço (SILVA *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que RA não tenha participação na patogenia dos CECs bucais, entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer este fato.

2.7. Receptores da família erb-B

A família erb-B de receptores tirosina-quinase é composta por quatro membros, EGFR (ErbB1, c-erbB-1 ou HER1), c-erbB-2 (ErbB2 ou HER2/Neu), c-erbB-3 (ErbB3 ou HER3) e c-erbB-4 (ErbB4 ou HER4) (revisado por O-CHAORENRAT *et al.*, 2000; O-CHAORENRAT *et al.*, 2002a). Todos eles têm em comum um domínio extracelular de ligação, um domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático com atividade de tirosina-quinase. Sob condições fisiológicas, a ativação dos receptores erb-B é controlada pela expressão dos membros peptídeos da família EGF (HOLBRO *et al.*, 2003, KUMAR-SINHA *et al.*, 2003), a qual é composta por mais de 30 produtos gênicos (O-CHAORENRAT *et al.*, 2002a). Existem três grupos de ligantes da família EGF, os quais compartilham cerca de 28% de homologia e 100% de conservação do resíduo 6 (cisteína) na

seqüência madura do peptídeo. O primeiro grupo inclui o próprio EGF, a anfiregulina (AR) e o fator de crescimento transformante- α (TGF- α), os quais se ligam especificamente ao receptor EGFR. O segundo grupo inclui a betacelulina (BTC), o fator de crescimento semelhante a EGF - ligante de heparina (HB-EGF) e a epiregulina (EPR), que mostram especificidade dupla tanto para EGFR como para c-erb-B4. O terceiro grupo é composto de heregulinas (HRGs), também conhecidas como neuregulinas (NGR), e forma dois subgrupos capazes de ligar nos receptores c-erb-B3 e c-erb-B4 (NRG-1 e NRG-2) ou somente c-erb-B4 (NRG-3 e NRG-4) (HOLBRO *et al.*, 2003; O-CHAROENRAT *et al.*, 2002a). Ligantes específicos para o receptor c-erb-B2 não foram identificados até o momento (MAGNIFICO *et al.*, 1998; PENUEL *et al.*, 2001; O-CHAORENRAT *et al.*, 2000).

A forma madura solúvel do EGF é liberada através de proteólise e age como um fator de crescimento parácrino ou autócrino. A interação EGF/receptor promove homo ou hetero-dimerização do receptor e subsequente auto-fosforilação ou fosforilação cruzada. Isto inicia uma complexa via de sinalização intracelular que culmina na fosforilação de fatores de transcrição, o que pode gerar um amplo espectro de atividades biológicas (revisado por O-CHAORENRAT *et al.*, 2000, O-CHAROENRAT *et al.*, 2002a). Uma vez ativado, o domínio tirosina-quinase desencadeia diversos sinais através das vias PI-3K, Akt, RAS/RAF e JAK/STAT (KUMAR-SINHA *et al.*, 2003). Um fato importante que merece ser salientado aqui é que a expressão forçada do oncogene H-ras em células MCF-10 (derivadas de câncer de mama) promove um aumento da expressão de FAS, o qual é mediado

pela ativação de PI-3K e MAP quinases, que por sua vez aumentam a quantidade de SREBP1 (YANG *et al.*, 2000).

O receptor c-erb-B2 é somente ativado, em condições normais, após sua heterodimerização com outro receptor da família erb-B (HOLBRO *et al.*, 2003). Por exemplo, EGF pode promover a formação de heterodímeros entre c-erb-B2 e EGFR, e heregulina entre c-erb-B2 e c-erb-B3 ou c-erb-B4 (MAGNIFICO *et al.*, 1998). Estes heterodímeros promovem uma ativação forte e prolongada das vias de sinalização intracelular (HOLBRO *et al.*, 2003).

2.8. Receptores da família erb-B e câncer

Todos os receptores da família erb-B estão envolvidos na regulação do crescimento, diferenciação e migração de vários tipos de células (KOLIBABA & DRUKER, 1997). São importantes não somente devido ao papel essencial que apresentam nos processos fisiológicos durante o desenvolvimento, mas também porque podem funcionar como oncogenes (HOLBRO *et al.*, 2003; KUMAR-SINHA *et al.*, 2003).

2.8.1. EGFR

EGFR tem sido implicado na patogênese de diversos tumores humanos, incluindo os de cérebro, mama, pulmão e CECs de cabeça e pescoço (OKAMOTO *et al.*, 2003), os quais apresentam geralmente amplificação gênica ou expressão

anormalmente alta do receptor (GRANDIS & TWEARDY, 1993; KUTTAN & BHAKTHAN, 1997; ISHITOYA *et al.*, 1989; KYIOTA *et al.*, 2000).

Altos níveis protéicos e de RNAs mensageiros para EGFR foram detectados em linhagens celulares e amostras teciduais de CECs de cabeça e pescoço, dentre estes CECs bucais (PARTRIDGE *et al.*, 1989; TODD *et al.*, 1989; SHIRASUNA *et al.* 1991; KUTTAN & BHAKTHAN, 1997). Estudos em linhagens celulares e amostras teciduais de CECs de cabeça e pescoço demonstraram que a amplificação do gene que codifica o EGFR não foi um achado comum, sendo que muitos dos tumores apresentaram alta expressão sem amplificação, como relatado por EISBRUCH *et al.* (1987), LEONARD *et al.* (1991), SARANATH *et al.* (1992), WERKMEISTER *et al.* (1996); WERKMEISTER *et al.* (2000) e O-CHAROENRAT *et al.* (2001), dentre outros.

Vários estudos têm investigado possíveis correlações entre a expressão alterada de EGF e o comportamento clínico de CECs de cabeça e pescoço (revisado por O-CHAROENRAT *et al.*, 2002a). Neste tipo de tumor, EGFR parece atuar no controle do fenótipo maligno de CECs bucais através da regulação de moléculas envolvidas nos processos invasivos e de angio/linfangiogênese. Embora a maioria dos estudos realizados procure implicações prognósticas relacionadas à expressão de EGFR em amostras clínicas destas lesões, muitos resultados contraditórios são relatados. Como por exemplo, os trabalhos de KAWAMOTO *et al.* (1991), STORKE *et al.* (1993), KUSUKAWA *et al.* (1996), MAIORANO *et al.* (1998), XIA *et al.* (1999), dentre outros, encontraram associação entre a expressão elevada de EGFR e um comportamento clínico mais agressivo,

sugerindo implicações prognósticas. Já outros trabalhos, como os de PARTRIDGE *et al.* (1988), SARAATH *et al.* (1992), BERGLER *et al.* (1996), WERKMEISTER *et al.* (1996) e WERKMEISTER *et al.* (2000) não relataram correlação entre a expressão de EGFR e o comportamento clínico do tumor.

Além do EGF, outro mitógeno potente, o TGF- α , parece estar envolvido na regulação autócrina das células tumorais de CECs bucais através de EGFR (KUTTAN & BHAKTHAN, 1997).

2.8.2. c-erb-B2

Alterações em c-erb-B2 estão muitas bem documentadas nos cânceres de mama e ovário, ao contrário de outros tumores (revisado por O-CHAROENRAT *et al.*, 2002a). Uma alta expressão e/ou amplificação de c-erb-B2 está associada com um pior prognóstico para o câncer de mama (YARDEN, 2001; KUMAR-SINHA *et al.*, 2003; ROSS *et al.*, 2003). Embora a alta expressão de c-erb-B2 nos carcinomas de mama e ovário seja geralmente causada por amplificação gênica (SLAMON *et al.*, 1989, KUMAR-SINHA *et al.*, 2003), em carcinomas de próstata isto parece ser resultado da ativação de sua transcrição (SIGNORETTI *et al.*, 2000). A alta expressão de c-erb-B2 está sendo usada como um alvo molecular para o tratamento de tumores de mama (DI LEIO *et al.*, 2002; BARTLETT *et al.*, 2003).

Expressão elevada de c-erb-B2 em CECs de cabeça e pescoço tem sido relatada em vários estudos utilizando técnicas como imunohistoquímica e RT-

PCR (FIELD *et al.*, 1992; HOU *et al.*, 1992; XIA *et al.*, 1997; XIA *et al.*, 1999; WILKMAN *et al.*, 1998; WERKMEISTER *et al.*, 2000; BEI *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2002; KHADEMI *et al.*, 2002; KUROPKAT *et al.*, 2002; NAGLER *et al.*, 2002b). Para os CECs bucais, alguns autores sugerem que a alta expressão deste oncogene possa estar correlacionada com um período de sobrevida mais curto, funcionando como fator prognóstico (HOU *et al.*, 1992; SHINTANI *et al.*, 1995; WERKMEISTER *et al.*, 1996; XIA *et al.*, 1997; WERKMEISTER *et al.*, 2000; O-CHAROENRAT *et al.*, 2002). KUROPKAT *et al.* (2002) encontraram que a alta expressão de c-erb-B2 em amostras de CECs de cavidade oral e faringe foi significativamente associada com um tempo de sobrevida global mais curto e simultânea a baixa expressão da proteína p27. No entanto, outros autores não encontraram correlação entre a expressão de c-erb-B2 e o prognóstico dos CECs bucais (FIELD *et al.*, 1992; NAGLER *et al.*, 2002b; KHAN *et al.*, 2002).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Estudar a produção da enzima FAS nas linhagens celulares derivadas de CECs bucais SCC-4, -9, -15 e -25;
2. Comparar o potencial proliferativo das linhagens SCC-4, -9, -15 e -25, correlacionando-o com a produção de FAS;
3. Analisar o papel da atividade de FAS nas mesmas linhagens celulares;
4. Descrever a expressão de RA, EGF, EGFR e c-erb-B2 nestas linhagens celulares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

As linhagens celulares SCC-4 (CRL-1624), SCC-9 (CRL-1629), SCC-15 (CRL-1623) e SCC-25 (CRL-1628) provenientes de CECs bucais humanos, foram adquiridas da “American Type Culture Collection” (ATCC, E.U.A.). De acordo com informações do catálogo da ATCC, todas as linhagens foram estabelecidas a partir de CECs primários de língua de pacientes do gênero masculino, com 55, 25, 55 e 70 anos, respectivamente.

Estas células foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura DMEM/F-12 (Invitrogen, E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen), 400 ng/ml de hidro cortisona (succinato sódico de hidro cortisona – Eurofarma, Brasil), 100 µg/ml de garamicina (sulfato de gentamicina 120 mg - Schering-Plough, Brasil) e 100 µg/ml de kanamicina (kanamycin sulfate, Gibco, E.U.A.) a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. As células utilizadas nos experimentos foram subcultivadas sempre que atingiam uma confluência de aproximadamente 60-70%. Para isto, o meio de cultura era removido, as células lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e então incubadas a 37°C com 0,5 ml ou 2 ml de tripsina a 2%, para frascos de 25 cm² ou 75 cm², respectivamente. Após um período que variou de 5 a 25 minutos, dependendo da linhagem, as células ficavam separadas do assoalho do frasco de cultura (o que

era determinado por observação em microscópio de contraste de fase), sendo então a ação da tripsina interrompida pela adição de 5 ml (frasco de 25 cm²) ou 10 ml (frasco de 75 cm²) de meio de cultura DMEM (Invitrogen) com 10% de FBS. A suspensão de células era transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning, E.U.A.) e estes centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante era removido e descartado e o “pellet” de células ressuspensionado em 5 ml de meio de cultura DMEM/F-12 com 10% de FBS, as células contadas e replaqueadas em novos frascos de 25 cm² ou 75 cm² (1x 10³ células em 5 ml de meio para frascos de 25 cm² e 1x10⁵ células em 10 ml de meio para frascos de 75 cm²). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

Visando manter o estoque congelado em nitrogênio líquido e trabalhar sempre com as células em passagens semelhantes, congelamos várias amostras de cada linhagem celular antes da realização dos experimentos. Para isto, as células foram suspensas em solução 1/1 de DMEM/F-12 contendo 20% de di-metil sulfóxido (DMSO, Sigma, E.U.A.) e DMEM/F-12 com 50% de FBS e congeladas em nitrogênio líquido. Para descongelar as células, os criotubos (Nunc) foram colocados em banho de água a 37°C e, após rápido descongelamento, transferidas para tubos de 15 ml contendo 10 ml de DMEM e centrifugadas. Os “pellets” foram então ressuspensionados em 5 ml de meio de cultura e as células plaqueadas (1x 10³ células em frascos de 25 cm² e 1x10⁵ células em frascos de 75 cm²) para realização dos experimentos. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as linhagens subcultivadas no máximo por dez passagens, e então descartadas.

Todos os experimentos apresentados neste trabalho foram feitos com o mesmo lote de FBS (Invitrogen, lote 1095407).

4.2. Proliferação celular

Para comparar o potencial proliferativo das linhagens SCC, foram realizadas curvas de proliferação, índices mitóticos e reações imunocitoquímicas para detecção dos marcadores de proliferação Ki-67 e PCNA (descritos no item 4.3. deste capítulo).

4.2.1. Curvas de proliferação

Para cada linhagem foi feito o plaqueamento de 5×10^3 células em 1ml de meio DMEM/F12 contendo 10% de FBS em cada poço de uma placa para cultura celular de 24 poços (Nunc). Após 24 horas, o meio foi trocado por DMEM/F-12 livre de FBS e as células incubadas por mais 48 horas. Para estimular o crescimento celular, ao término deste período foi novamente colocado o meio DMEM/F-12 contendo 10% de FBS. Nos períodos de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a adição do meio com FBS, as células de 3 poços de cada placa foram lavadas duas vezes com PBS a 37 °C e incubadas com 0,3 ml de tripsina a 2%, também a 37°C por 20-25 minutos, até que estivessem completamente separadas do assoalho da placa. A tripsina foi inativada com 2 ml de meio DMEM

com 10% de FBS e alíquotas de 100 µl diluídas em 10 ml de isotom (Coulter Balanced Eletrolytic Solution, Beckman, E.U.A.), sendo esta suspensão utilizada para contagem em contador automático de partículas (Coulter Counter Z-1, Beckman, E.U.A.). Todas as contagens foram feitas em triplicata e os experimentos repetidos quatro vezes. Após obtenção dos valores médios de cada período, foram construídas curvas de proliferação utilizando-se o programa Excel (Microsoft, E.U.A.).

4.2.2. Índices mitóticos

Para o cálculo dos índices mitóticos foram semeadas 2×10^4 células em 0,4 ml de meio DMEM/F-12 com 10% de FBS em cada poço de uma lâmina para cultura celular com oito poços (Lab Tek Nunc, Naperville, E.U.A.). Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram “carenciadas” em meio DMEM/F-12 livre de FBS por um período de 48 horas. Logo após, o meio DMEM/F-12 com 10% de FBS foi novamente adicionado e depois de 45 horas as células foram fixadas em álcool 70% por 15 minutos, coradas com hematoxilina de Carazzi (Nuclear, Brasil) por 2 minutos, e as lâminas montadas com bálsamo do Canadá. O número de mitoses foi contado com o auxílio do sistema Kontron 400 (Carl Zeiss, Alemanha) em dois poços para cada linhagem celular e o índice mitótico calculado.

4.3. Imunocitoquímica

Para auxiliar na determinação do potencial proliferativo das linhagens SCC foram realizadas reações imunocitoquímicas com os anticorpos primários anti-Ki-67 (Anti-Human Ki-67 antigen, clone MIB-1, Dako, Dinamarca) e anti-PCNA (Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, clone PC10, Dako). A expressão da proteína humana Ki-67 está estritamente associada a células em proliferação e ausente em células quiescentes (GERDES *et al.*, 1984). O fato de que esta proteína está presente durante todas as fases do ciclo celular, tendo uma expressão máxima nas fases G2 e M (SITTEL *et al.*, 1999), a faz um excelente marcador para determinar a fração de crescimento de uma determinada população celular (KILL, 1996; SITTEL *et al.*, 1999; SCHOLZEN & GERDES, 2000). TUMULURI *et al.* (2002) demonstraram que a proliferação celular mensurada pela positividade imunohistoquímica para o antígeno Ki-67 tem forte correlação com a gradação histológica em CECs bucais humanos. CARLOS DE VICENTE *et al.* (2002) encontraram índice de positividade significativamente maior para Ki-67 em CECs bucais indiferenciados, estando relacionado com pior prognóstico. O PCNA é uma proteína nuclear ácida, não histônica, de 36 kDa (MIYACHI *et al.*, 1978), essencial na síntese de DNA, estando presente principalmente no final de G1 e na fase S do ciclo celular (HUANG *et al.*, 1994; TSURIMOTO, 1998; SITTEL *et al.*, 1999), declinando durante as fases G2 e M (SITTEL *et al.*, 1999). O PCNA também está envolvido em processos de reparo do

DNA (TOSCHI & BRAVO, 1998), estando diretamente relacionado com o índice de proliferação celular (GOMES & BURGERS *et al.*, 2000).

Também foram realizadas reações imunocitoquímicas com os anticorpos anti-FAS (Transduction Laboratories, E.U.A.), anti-EGF (clone Ab-3, Oncogene, E.U.A.), anti-EGFR (clone H11, Dako) e anti-c-erb-B2 (Dako).

Utilizou-se uma lâmina para cultura celular com oito poços (Lab Tek Nunc, Naperville, IL) para cada marcador (dois poços para cada linhagem), os quais receberam 2×10^4 células suspensas em 0,4 ml de DMEM/F-12 com 10% de FBS. Após 24 horas do plaqueamento as células foram “carenciadas” pela adição de meio DMEM/F-12 livre de FBS por 48 horas, após lavagem com PBS. Em seguida as células foram novamente incubadas em meio DMEM/F-12 com 10% de FBS e, depois de 24 horas, fixadas em álcool 70% por 15 minutos, para a detecção de Ki-67 e PCNA ou paraformaldeído (3,7%) contendo 0.12 M de sacarose a 37°C por 15 minutos, para a detecção de FAS, EGFR, c-erb-B2 e EGF.

As lâminas fixadas foram então incubadas com os anticorpos primários por 16 horas a 4°C. Para cada anticorpo foi utilizada a seguinte diluição: anti-Ki-67 (1:200), anti-PCNA (1:60.000), anti-FAS (1:3.000), anti-EGF (1:30), anti-EGFR (1:200) e anti-c-erb-B2 (1:50). Em seqüência as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Strept ABC Complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, Dako) por 30 minutos a 37°C, diluídos a 1:200 para as reações com anti-Ki-67, anti-FAS e anti-EGF e a 1:500 quando os anticorpos primários foram anti-PCNA, anti-EGFR e anti-c-erb-B2. Depois de

lavadas com PBS e incubadas com o complexo Streptavidina – Biotina (Dako) por mais 30 minutos, as lâminas foram coradas com 3,3' tetrahidrocloreto de diaminobenzidina ($C_{12}H_{19}N_4 \cdot 4 HCl$) - DAB (Sigma), contra-coradas com hematoxilina de Carazzi (Nuclear) e montadas em bálsamo do Canadá.

4.4. Preparação dos extratos protéicos das células SCC

Os “pellets” de células utilizados para a extração protéica foram obtidos por raspagem dos frascos de cultura com um “scraper” (Disposable Cell Scraper, Costar, E.U.A.) quando as células estavam aproximadamente 70% confluentes. As proteínas foram extraídas em um tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton-X, 20 mM de Tris pH 8,0, 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA e 1 mM de NaF. Os inibidores de proteinases PMSF (1mM), NEM (1 μ M), Benzamidina (1 μ M), inibidor de tripsina (“soybean trypsin inhibitor”) (1 μ M) e Pepstatina A (1 μ M) foram adicionados ao tampão de lise imediatamente antes do uso. Cem microlitros deste tampão foram colocados nos tubos contendo os “pellets” celulares, sendo mantidos no gelo por 30 minutos e agitados a cada 10 minutos. Depois deste período foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados, sendo uma amostra de 2,5 μ l separada para quantificação protéica. Todas as alíquotas dos extratos protéicos foram imediatamente congeladas em gelo seco e transferidas para o freezer - 80°C, no qual foram mantidas até o momento do uso.

A quantidade de proteína total dos extratos protéicos foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o reagente de Bradford (Sigma) e um espectrofotômetro (Spectronic Genesys 2) ajustado para 595 nm.

4.5. Separação eletroforética de proteínas e western blotting

Quantidades iguais de proteínas de cada extrato celular foram então misturadas com um tampão de amostra redutor 4x concentrado (2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol, 2% de β -mercaptoetanol), fervidas por 5 minutos e separadas eletroforeticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 6% em tampão de corrida (2,5 mM de Tris-HCl pH 8,0, 19 mM de glicina e 0,3 mM de SDS). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Scuell, E.U.A.) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl pH 8,0, 9,6 mM de glicina e 20% metanol por um período que variou de quatro a cinco horas e meia. Logo após, todas as membranas foram coradas com o corante "Ponceau S" (Sigma) para verificar a eficácia da transferência. As membranas foram então bloqueadas por 16 horas a 4° C em uma solução contendo 5% leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20 (TBST). Posteriormente as membranas foram incubadas por 2h a temperatura ambiente com os anticorpos primários diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado nas seguintes diluições: anti-FAS (1:3.000), anti-EGFR (1:1.000), anti-c-erb-B2 (1:20.000), anti-RA (clone PG-21, Upstate

Biotechnology, E.U.A., 1,5 µg/ml) e anti-β-actina (clone AC-15, Sigma, 1:40.000). Foram então realizadas quatro lavagens de 15 minutos cada com TBST, seguidas de incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase na diluição de 1:1000 (anti-IgG de camundongo para as reações contra FAS, EGFR e β-actina e anti-IgG de coelho para as reações contra c-erb-B2 e RA), por 1h a temperatura ambiente, sendo então realizadas quatro lavagens de 15 minutos cada com TBST. As reações foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando o kit de detecção ECL - Western Blotting Analysis System (Amershan Pharmacia Biotech, E.U.A.) e expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., E.U.A.). Os resultados foram quantificados por análise densitométrica, realizada com o auxílio de um densitômetro modelo GS-700 (Bio Rad, E.U.A.), e do programa Molecular Analyst (Bio Rad).

4.6. Purificação de RNA e RT-PCR

RNA total foi extraído de “pellets” celulares usando o reagente Trizol (Invitrogen). Antes das reações de RT, todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1 U de DNase I (Amplification Grade, Invitrogen) por 10 minutos a temperatura ambiente, para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. Para a síntese de cDNA, 5µg de RNA total foram reversamente transcritos em uma reação com volume final de 21 µl, contendo 0,5 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNase, 50 U da enzima

Superscrit II RT (Invitrogen), 0,5 µg de “primers” oligo-dT (Invitrogen) e tampão 1 X (contendo 1,5 mM MgCl₂). As reações foram realizadas a 42 °C por 50 minutos, seguidas de incubação a 70°C por 15 minutos. Reações sem a enzima RT foram usadas como controles negativos.

Para a amplificação específica dos cDNAs através de PCR, “primers” específicos para FAS (sense: AACTCCTTGGCGGAAGAGA; anti-sense: TAGGACCCCGTGGGAATGTCA) e GAPDH (sense: GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC; anti-sense: GAAGATGGTGATGGGATTTC) foram delineados usando o programa “Amplify 1.2” (Universidade de Wiscosin, Madison, E.U.A.) e seqüências dos respectivos RNAs mensageiros provenientes do “Gene Bank” (NCBI - “National Center for Biotechnology Information” - NIH, E.U.A.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os transcritos para FAS e GAPDH foram amplificados em reações de 50 µl contendo 2 µl de cada cDNA, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 0,2 mM de cada “primer”. As condições do PCR foram: 95 °C por 5 minutos, 45 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 4 minutos. Dois microlitros de cada produto de PCR foram separados eletroforéticamente em géis de poliacrilamida não desnaturantes a 8% e corados pela prata de acordo com SANGUINETTI *et al.* (1994). As bandas correspondentes a FAS (152 pb) e GADPH (226 pb) foram analisadas por densitometria, sendo os resultados normalizados pela divisão dos valores obtidos para FAS pelos valores de GADPH.

4.7. Inibição da atividade de FAS com cerulenina

Para os experimentos de inibição da atividade da FAS com cerulenina, foram plaqueadas 5×10^3 células da linhagem SCC-9 em 1 ml de DMEM/F-12 com 10% de FBS em cada poço de placas de cultura de 24 poços. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram incubadas por 48 horas em meio DMEM/F-12 livre de FBS, o qual foi a seguir substituído por DMEM/F-12 com 10% FBS contendo 5 $\mu\text{g/ml}$ de cerulenina (Sigma) no grupo experimental e apenas DMSO (Sigma) nos controles (a cerulenina foi dissolvida em DMSO). Nos períodos de 48, 96, 144 e 192 horas após o início do tratamento, as células de três poços de cada grupo foram lavadas duas vezes com PBS e soltas com 0,3 ml de tripsina a 2% a 37°C por 20-25 minutos. A tripsina foi inativada com 2 ml de meio DMEM contendo 10% de FBS e alíquotas de 100 μl foram coletadas, colocadas em frasco contendo 10 ml de isoton e contadas em contador automático de partículas (Coulter Counter Z-1, Beckman). Todas as contagens foram feitas em triplicata e após obtenção da média dos valores para cada período, foi construído um gráfico de proliferação no programa Excel (Microsoft).

4.8. Tratamento das células com EGF exógeno

Para verificar o efeito de EGF exógeno sobre as células SCC, foram plaqueadas 1×10^5 células (das linhagens SCC-9 e -15) em oito frascos de cultura

de 75 cm² (sendo quatro para o grupo controle e quatro para o grupo experimental) em meio DMEM/F-12 com 10% de FBS. Quando atingiram aproximadamente 60 – 70% de confluência, as células foram incubadas em meio DMEM/F-12 com 0,5% de FBS por um período de 16 horas, de acordo com ETTENBERG *et al.* (2001). Logo a seguir o meio foi trocado por DMEM/F-12 com 0,5% de FBS mais 150 ng/ml de EGF (Sigma), sendo dois frascos tratados por 12 horas e dois frascos tratados por 24 horas. Para cada período de tratamento, outros dois frascos foram usados como controles, permanecendo apenas com DMEM/F-12 com 0,5% FBS. As células foram coletadas por raspagem e as proteínas extraídas quantificadas, separadas eletroforicamente e transferidas para membranas de nitrocelulose, como descrito anteriormente. Depois de bloqueadas por 16 horas a 4° C, as membranas foram incubadas por 2h à temperatura ambiente com anticorpos primários contra FAS, EGFR, c-erb-B2 e β -actina, nas mesmas diluições descritas anteriormente. Após incubação com os respectivos anticorpos secundários, as reações foram reveladas como descrito no item 4.5. deste capítulo.

Para avaliar o efeito do EGF exógeno sobre a proliferação, 5×10^3 células da linhagem SCC-9 foram plaqueadas em cada poço de placas de 24 poços em 1ml de meio DMEM/F-12 contendo 10% de FBS. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram incubadas por 16 horas com meio DMEM/F-12 com 0,5% de FBS. Este foi então trocado por DMEM/F-12 com 0,5% de FBS contendo 150 ng/ml de EGF + DMSO para o grupo controle ou DMEM/F-

12 contendo 150 ng/ml de EGF + 5 µg/ml de cerulenina. Um terceiro grupo experimental, tratado somente com DMEM/F-12 com 0,5% de FBS foi também realizado. Após 48, 92, 144 e 192 horas, as células de três poços de cada grupo foram lavadas duas vezes com PBS, soltas com de tripsina e contadas em contador automático de células. Após obtenção da média dos valores de contagem de cada período, foi construído um gráfico da curva de proliferação como descrito anteriormente.

4.9. Análises Estatísticas

A significância estatística dos resultados foi verificada através da análise de variância não paramétrica (testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) e do teste Qui-quadrado para comparação entre os grupos, com o auxílio do programa computacional SigmaStat (Jandel Scientific Software, EUA). O nível de significância adotado foi de 5%.

5. Resultados

5.1. Células

Os experimentos deste trabalho foram realizados com as linhagens celulares SCC-4, -9, -15 e -25, que apesar de derivarem de CECs de língua, apresentam características biológicas bastante diferentes.

As linhagens SCC-4 e -15 se mostraram semelhantes no aspecto morfológico, ambas com células grandes e arredondadas com nucléolos evidentes, células multinucleadas e crescimento formando redes de células (Figuras 1A e 1C). Os períodos de incubação com tripsina utilizados para que as células soltassem dos frascos ou placas de cultura foram de 6 minutos para a SCC-15 e 7 minutos para a SCC-4. Uma particularidade observada na linhagem SCC-15 foi o fato das células formarem agregados de difícil separação, os quais eram dissociados mecanicamente através de pipetagem, antes das quantificações no contador automático de células.

A linhagem SCC-9 é composta por células também arredondadas, porém menores do que as células SCC-4 e -15. Os núcleos são grandes com nucléolos bastante evidentes e, ao contrário das linhagens SCC-4 e -15, poucas células multinucleadas. Esta linhagem também apresentou um padrão de crescimento em rede (Figura 1B), sendo necessário um tempo mais longo de tripsinização (8 minutos) para soltá-las dos frascos de cultura.

Células pequenas, com citoplasma escasso, núcleo grande e nucléolos evidentes, com aspecto variando de arredondado a fusiforme (Figura 1 D)

caracterizam a linhagem SCC-25. O padrão de crescimento desta linhagem foi diferente, sendo observada a formação de pequenos grumos. Esta linhagem necessitou o menor tempo de tripsinização (cerca de 5 minutos) e quando observadas ainda em suspensão ao microscópio de contraste de fase, sempre se apresentaram mais soltas e dispersas do que as outras três linhagens estudadas.

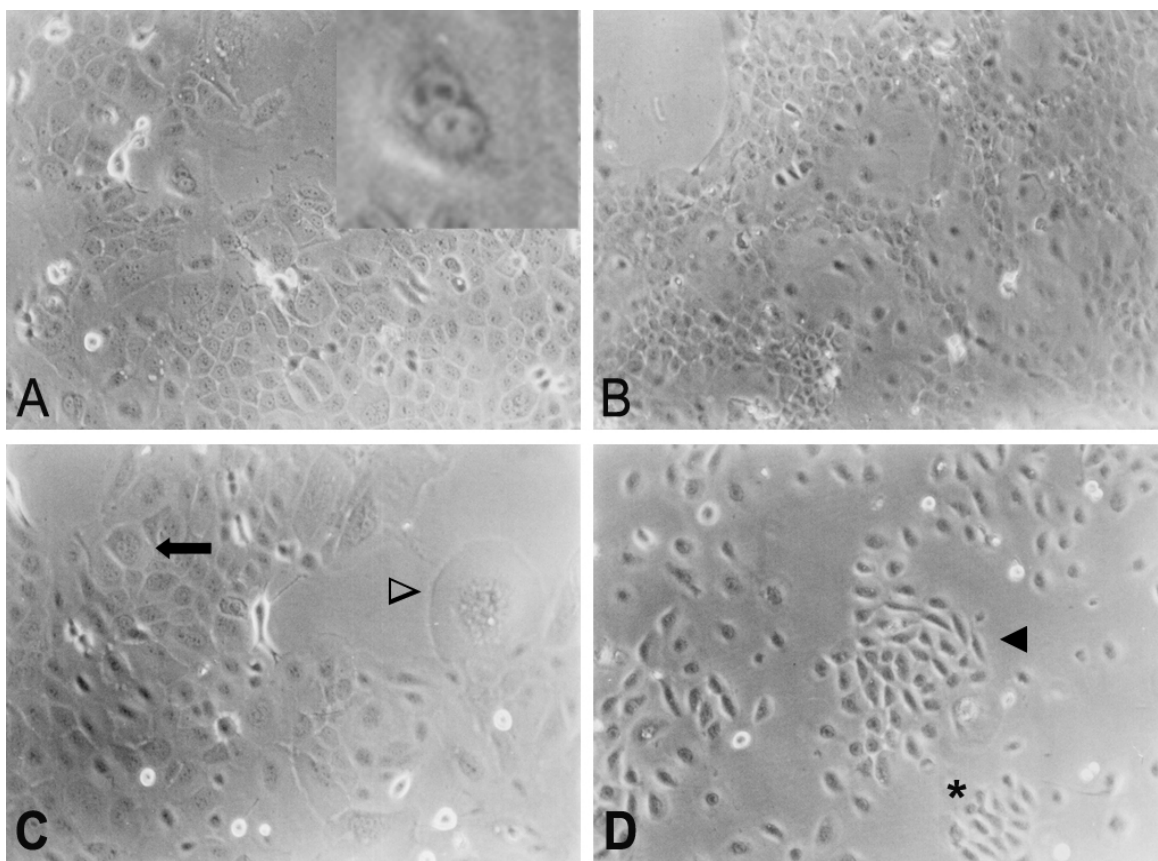


Figura 1– Aspecto morfológico das linhagens celulares SCC-4 (**A**), -9 (**B**), -15 (**C**) e -25 (**D**) em culturas subconfluentes, observadas em microscopia de contraste de fase (aumento original: 100x). Em **A** observa-se a presença de nucléolos evidentes (detalhe em maior aumento), em **B** a formação de redes de células característica da linhagem SCC-9, em **C** a presença de célula grande (▷) e células multinucleadas (◀) e em **D** células fusiformes presentes na linhagem -25 (◄) com seu típico crescimento em grumos (*).

5.2. Proliferação Celular

O potencial proliferativo das linhagens celulares SCC foi estimado através da construção de curvas de proliferação, utilizando um contador automático de células, do cálculo do índice mitótico e de reações imunocitoquímicas para os marcadores de proliferação Ki-67 e PCNA.

5.2.1. Curvas de Proliferação

Visando comparar o crescimento das quatro linhagens SCC, foram realizadas neste trabalho quatro curvas de proliferação, nas quais as células foram cultivadas em placas de 24 poços, tripsinizadas e contadas em contador automático de células em intervalos de 24 horas, num período total de 192 horas.

Em todos os experimentos, a linhagem que apresentou maior potencial proliferativo foi a SCC-25, a qual mostrou um maior número de células em todos os períodos. As linhagens SCC-4, -9 e -15 se comportaram de maneira semelhante, não havendo grandes diferenças entre elas nos intervalos de tempo analisados. De uma maneira geral, o pico de proliferação variou entre 144 e 168 horas para todas as linhagens. No período de 192 horas após o plaqueamento, observou-se com frequência um declínio no número de células, provavelmente porque estas estavam próximas da confluência, o que provocava a morte celular. No primeiro experimento de proliferação (Figura 2) a linhagem que mais proliferou foi a SCC-25, seguida da SCC-15. As células SCC-4 e -9 apresentaram índices de proliferação muito semelhantes, com pequenas variações em alguns períodos da

contagem. No segundo experimento de proliferação (Figura 3) a linhagem que mais proliferou também foi a SCC-25, seguida da SCC -15, -9 e -4. No terceiro e quarto experimentos de proliferação os resultados foram semelhantes, com um crescimento significativamente maior das células SCC-25, seguida das outras três linhagens com valores muito próximos (Figuras 4 e 5).

Em conjunto, estes resultados demonstraram claramente que a linhagem que apresenta maior potencial proliferativo é a SCC-25.

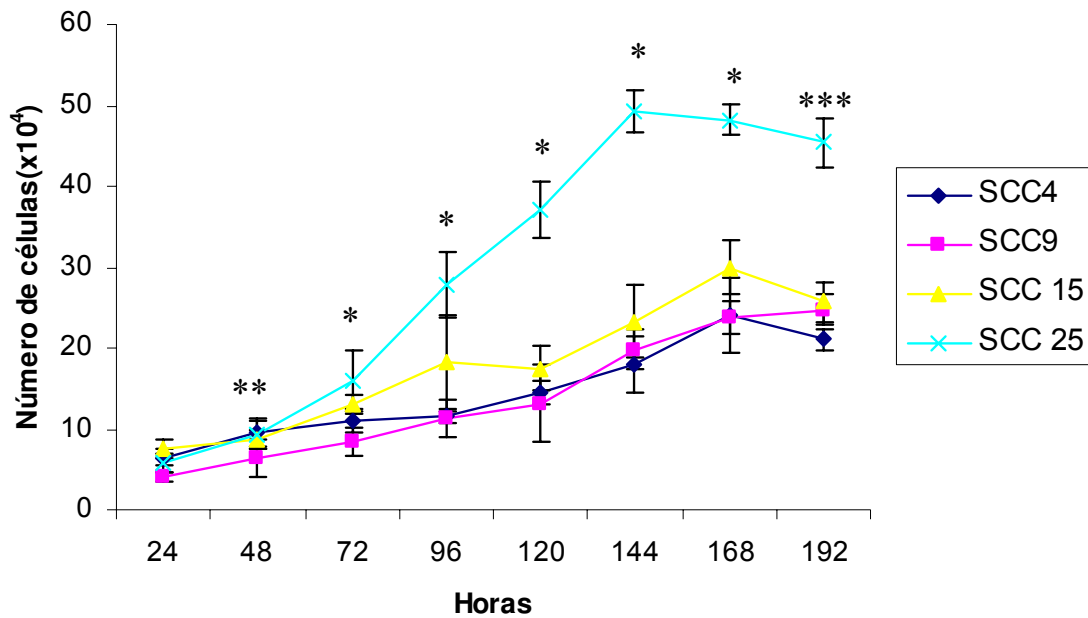


Figura 2- Gráfico mostrando os resultados do primeiro experimento de proliferação (Kruskal-Wallis: * $p < 0,001$; ** $p = 0,003$; *** $p = 0,02$).

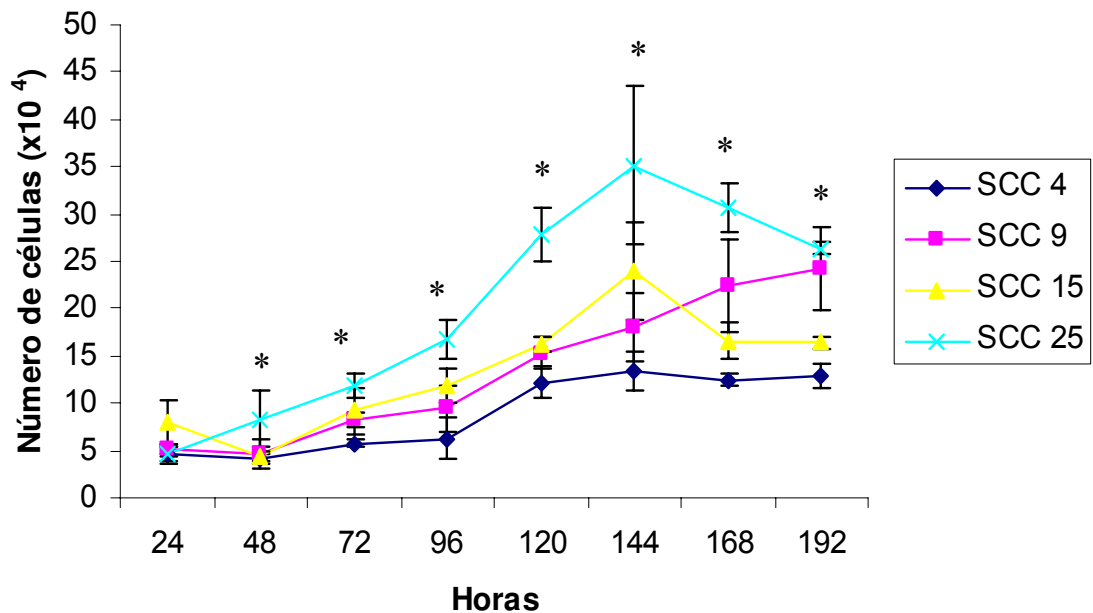


Figura 3- Gráfico representando os valores obtidos no segundo experimento de proliferação (Kruskal-Wallis: * $p < 0,001$).

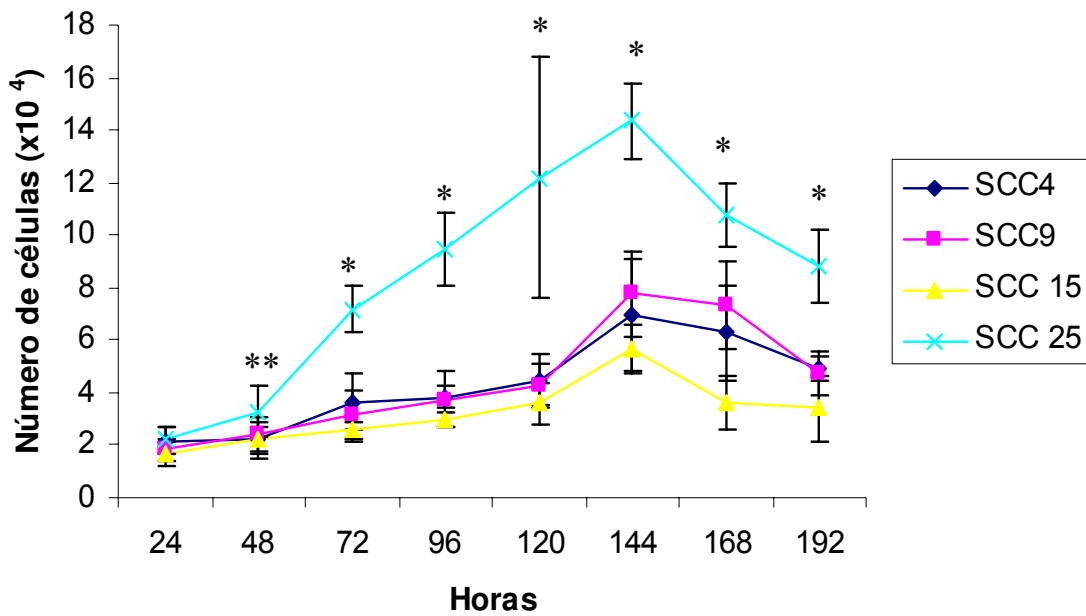


Figura 4- Resultados do terceiro experimento de proliferação (Kruskal-Wallis: * $p < 0,001$; ** $p = 0,029$).

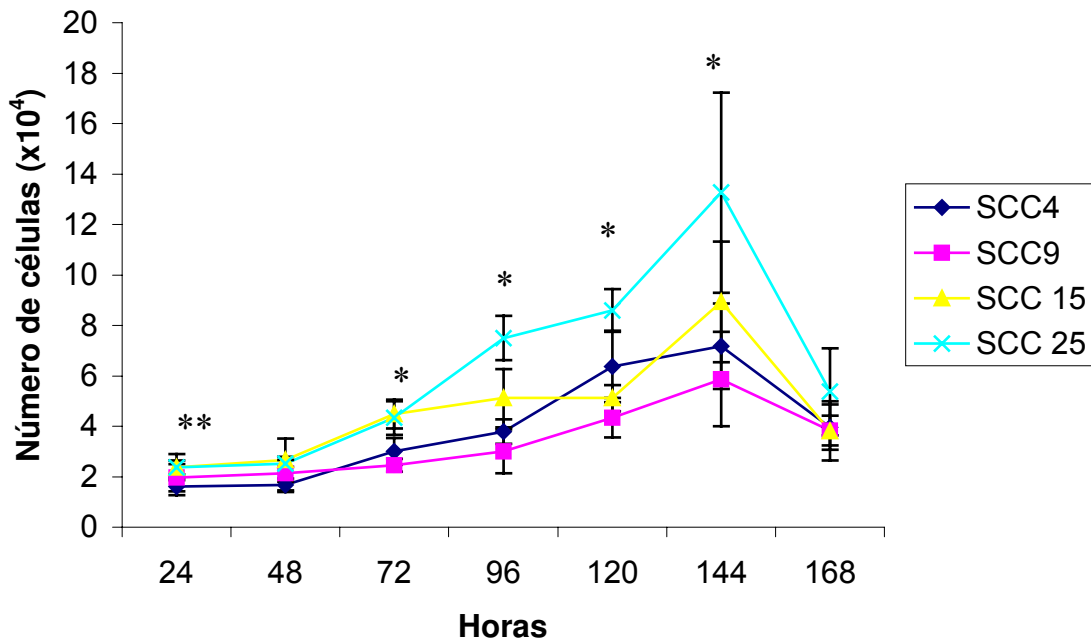


Figura 5- Representação gráfica dos resultados do quarto experimento de proliferação (Kruskal-Wallis: * $p < 0,001$; ** $p = 0,005$).

5.2.2. Índices Mitóticos

Para a determinação do índice mitótico das células SCC-4, -9, -15 e -25, estas células foram semeadas em lâmina para cultura celular de oito poços (dois poços para cada linhagem) e coradas com hematoxilina de Carazzi. Diferentes fases da mitose puderam ser observadas, tais como anáfase, metáfase e telófase, além da eventual presença de mitoses atípicas (Figura 6). A quantificação do número de mitoses foi realizada com o auxílio sistema Kontron 400, no qual tanto o número de mitoses quanto o número total de células por campo foram contados (média de 50 campos por poço, dois poços de cada linhagem) e a porcentagem de células em mitose calculada. Como pode ser observado na Figura 7, 5,04% das células da linhagem SCC-4, 5,92% das células da linhagem SCC-9, 4,58% das células da linhagem SCC-15 e 9,4% das células da SCC-25 estavam em mitose.

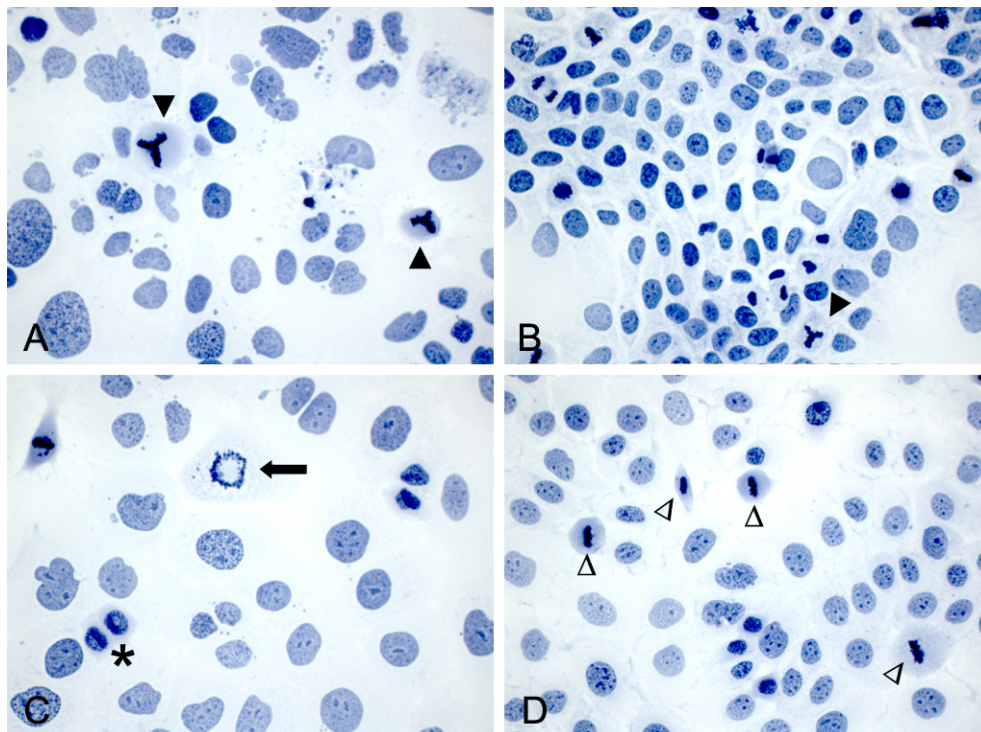


Figura 6- Fotografias representativas das linhagens celulares SCC-4 (A), -9 (B), -15 (C) e -25 (D) coradas em hematoxilina de Carazzi, utilizadas para contagem das mitoses. Em A e B (◄) observam-se células em metáfases atípicas, em C célula em anáfase (◄) e telófase (*), em D (▷) a presença de várias células em mitose (aumento original: 400x).

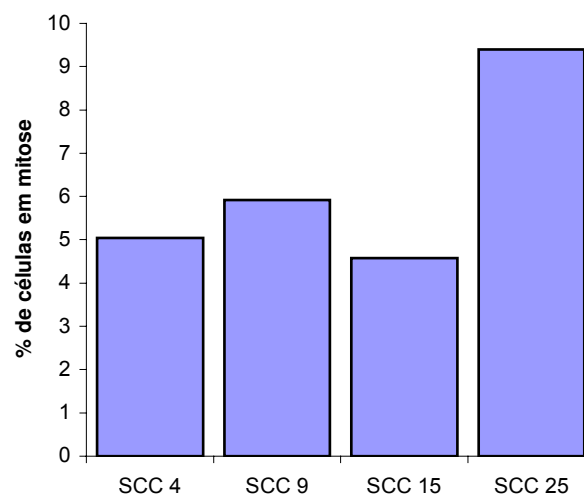


Figura 7- Representação gráfica dos índices mitóticos obtidos para as linhagens SCC-4, -9, -15 e -25 ($\chi^2 = 55,75$; $p < 0,001$).

5.2.3. Detecção imunocitoquímica de Ki-67 e PCNA nas células SCC

Para comparar o potencial de crescimento das células SCC através da marcação com anticorpos anti-Ki-67 ou anti-PCNA, consideramos positivos todos os núcleos com coloração marrom, independentemente da intensidade (Figuras 8 e 10). Nas reações imunocitoquímicas para detectar o marcador de proliferação ki-67, a linhagem SCC-25 apresentou maior número de células com núcleo positivo, seguida da SCC-9, -4 e -15. O gráfico da Figura 9 mostra o resultado da contagem de células positivas para Ki-67, na qual a SCC-25 apresentou 95,98% de positividade, seguida pela SCC-9 com 79,96%, SCC-4 com 67,51% e SCC-15 com 65,58%.

Os resultados para o marcador de proliferação PCNA foram semelhantes aos obtidos para o Ki-67, sendo que a positividade nuclear para esta proteína também variou de fraca e moderada a forte (Figura 10). A figura 11 mostra a porcentagem de células positivas para este marcador, que foi 79,31% para a linhagem SCC-25, seguida de 65,10% para a linhagem SCC-4, 61,44% para a SCC-9 e 59,13% para as células SCC-15.

A maior positividade para as proteínas Ki-67 e PCNA na linhagem SCC-25 foram estatisticamente significantes (χ^2 , $p < 0,001$) e estão em concordância com os resultados das curvas de proliferação, nas quais esta foi a linhagem que mais proliferou.

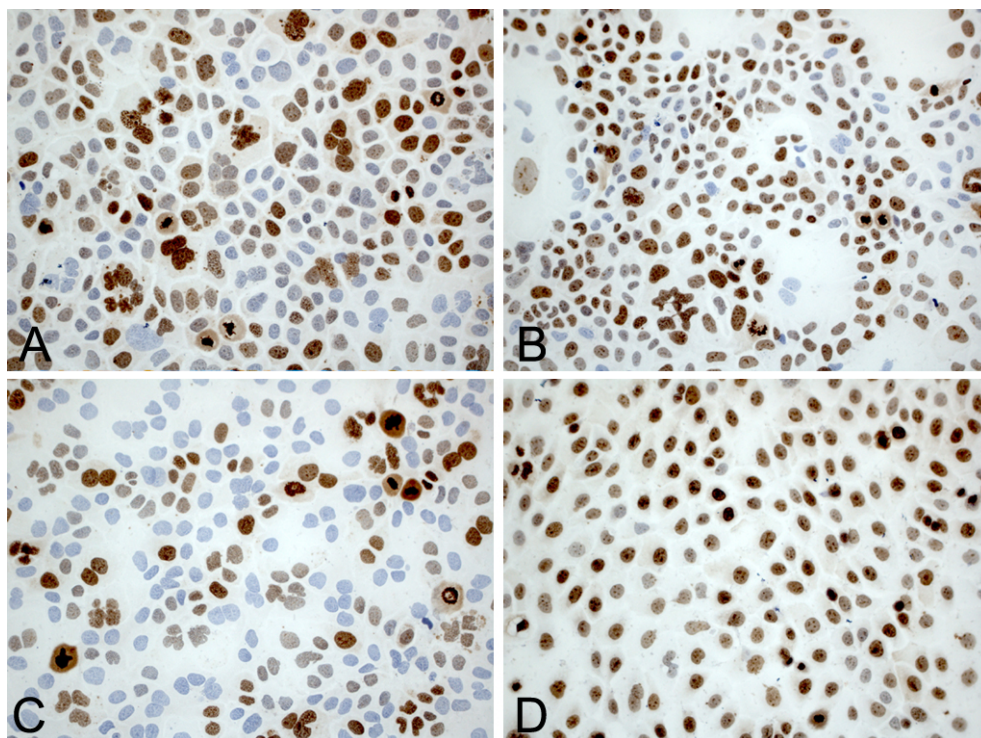


Figura 8 – Reação imunocitoquímica para a detecção do marcador de proliferação Ki-67. Pode-se notar que a coloração dos núcleos celulares variou de marrom claro a escuro, sendo nítida a presença de maior número de células positivas na linhagem SCC-25 **(D)**. **(A)** SCC-4, **(B)** SCC-9 e **(C)** SCC-15 (aumento original: 200x).

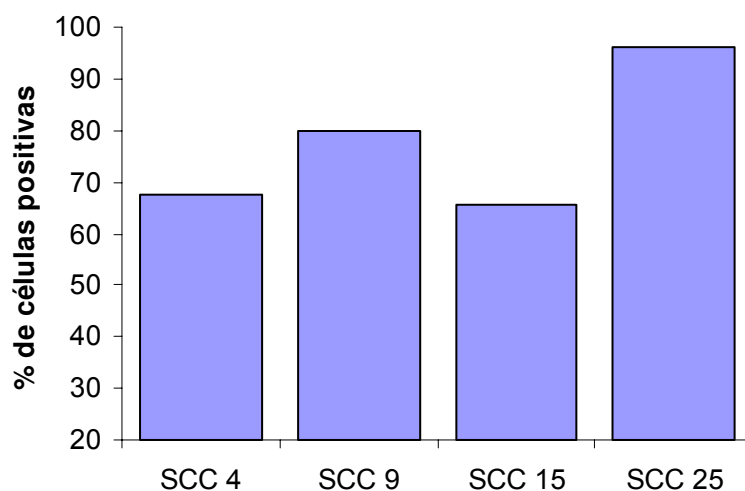


Figura 9- Porcentagem de células positivas para o marcador de proliferação Ki-67 ($\chi^2 = 958,64$; $p < 0,001$).

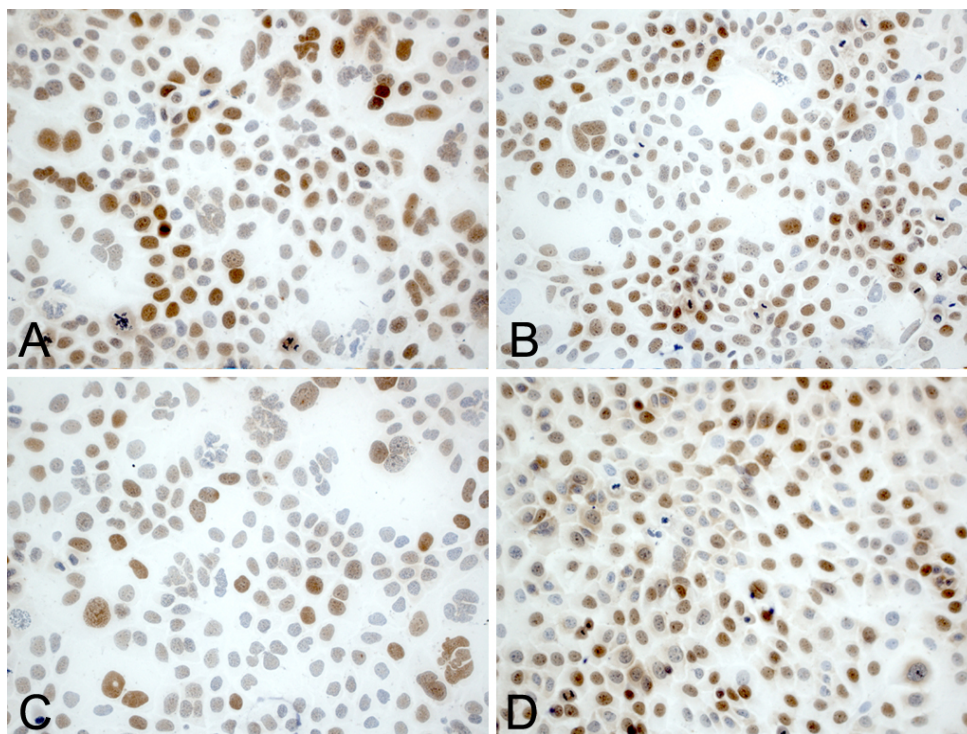


Figura10 – Reação imunocitoquímica para a detecção do marcador de proliferação PCNA. A coloração dos núcleos celulares variou em intensidade, de marrom claro a escuro e o maior número de células positivas foi observado na linhagem SCC-25 **(D)**. **(A)** SCC-4, **(B)** SCC-9, **(C)** SCC-15 (aumento original: 200x).

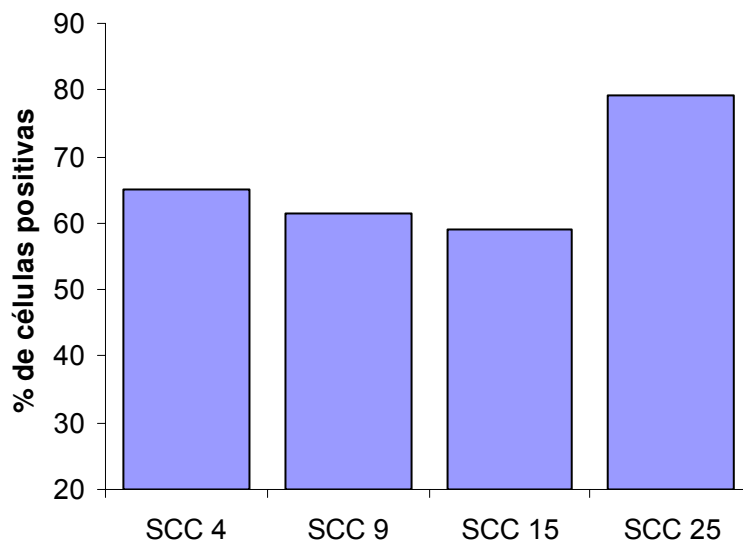


Figura 11 - Porcentagem de células positivas para o marcador de proliferação PCNA ($\chi^2 = 183,07$; $p < 0,001$).

5.3. Produção de FAS pelas células SCC

A produção de FAS pelas linhagens celulares SCC-4, -9, -15 e -25 foi avaliada através de experimentos de RT-PCR, western blotting e de reações imunocitoquímicas.

Os experimentos de RT-PCR realizados neste trabalho (Figura 13) foram feitos por Karina Gottardelo Zecchin, doutoranda do programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP. A Figura 13 A mostra um gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% corado pela prata, no qual dois microlitros de cada produto de PCR foram aplicados. Observa-se que a linhagem SCC-9 foi a que apresentou a maior expressão de RNAs mensageiros para FAS, seguida da SCC-25. Quantidades menores destes mensageiros foram detectadas nas linhagens -4 e -15. A análise densitométrica das bandas pode ser observada na Figura 13 B.

Para os ensaios de western blotting, quarenta microgramas de extrato protéico das linhagens SCC-4, -9, -15 e -25 foram separados eletroforéticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 6% e transferidos para membranas de nitrocelulose. A Figura 14 A mostra que todas as linhagens celulares produzem a proteína FAS, sendo as maiores quantidades detectadas nas células SCC-9 e -25. No painel inferior desta mesma figura observamos que a quantidade de proteínas presente em cada canaleta do gel foi equivalente, através da reação com anticorpos contra a proteína de citoesqueleto β -actina. Na Figura 14 B podemos observar a análise densitométrica das bandas correspondentes à

proteína FAS. Estes achados foram confirmados por outros três experimentos semelhantes. Os resultados obtidos nas reações de western blotting são semelhantes aos encontrados nos experimentos de RT-PCR (Figura 13), sugerindo que a quantidade da proteína FAS nas células SCC é regulada pelo controle da quantidade de seus RNAs mensageiros e não por controle pós-traducional, pelo menos nas condições aqui estudadas.

Visando verificar a distribuição intracelular da proteína FAS nas células SCC foram realizadas reações imunocitoquímicas com os mesmos anticorpos primários utilizados nos western blots. Todas as linhagens apresentaram positividade para a maioria das células, exibindo marcação citoplasmática que variou de fraca a intensa, sendo algumas vezes mais forte na região perinuclear (Figura 15). Reações mais intensas e um maior número de células positivas para a proteína FAS foram encontradas nas linhagens SCC-9 e -25 (Figura 15), confirmando os achados de RT-PCR e de western blotting, nos quais estas células foram as que mais produziram tanto RNAs mensageiros como a proteína FAS.

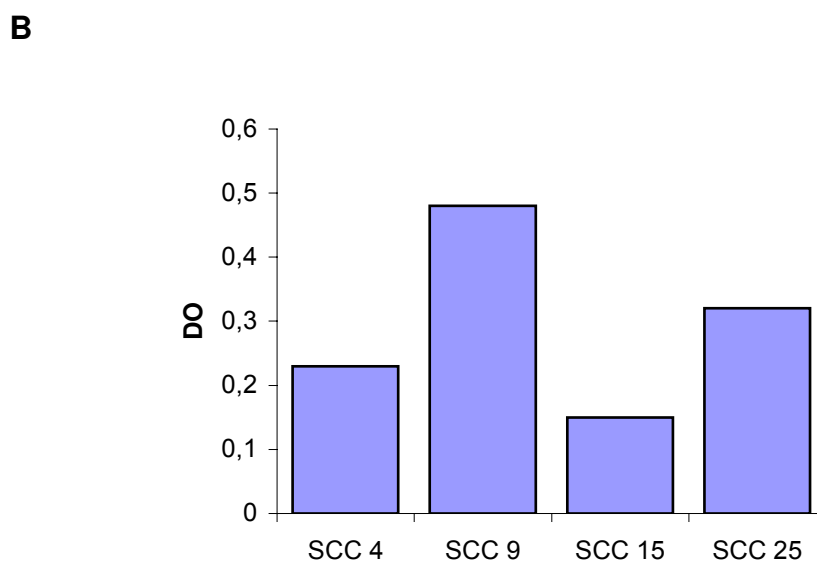
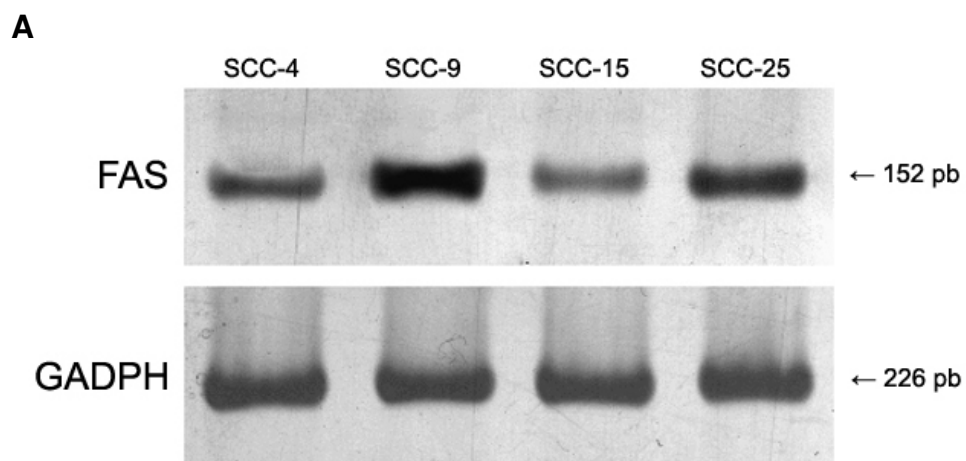


Figura 13- Reação de RT-PCR para verificar a expressão de RNAs mensageiros para FAS nas linhagens SCC-4, -9, -15 e -25. **(A)** Dois microlitros de cada produto de PCR foram separados eletroforéticamente em géis de poliacrilamida não desnaturantes a 8% e corados pela prata. Observa-se maior expressão de FAS na linhagem SCC-9, seguida da SCC-25. Quantidades menores foram expressas pelas linhagens SCC-4 e -15. **(B)** análise densitométrica das bandas de FAS normalizadas pelas respectivas bandas de GADPH.

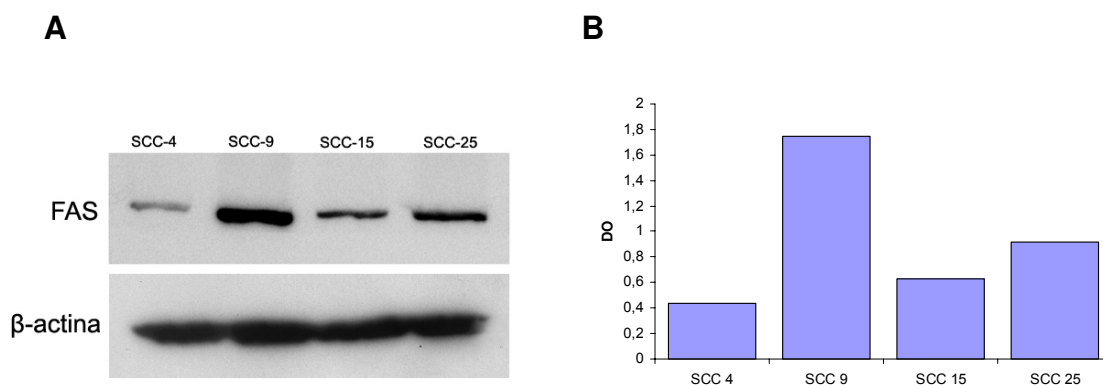


Figura 14- (A) Western blotting usando proteínas extraídas das células SCC e anticorpos anti-FAS ou anti- β -actina. Maiores quantidades da enzima FAS foram detectadas nas linhagens SCC-9 e -25. O anticorpo anti- β -actina foi utilizado para comprovar a presença de quantidades semelhantes de proteína em cada canaleta. **(B)** Análise densitométrica das bandas.

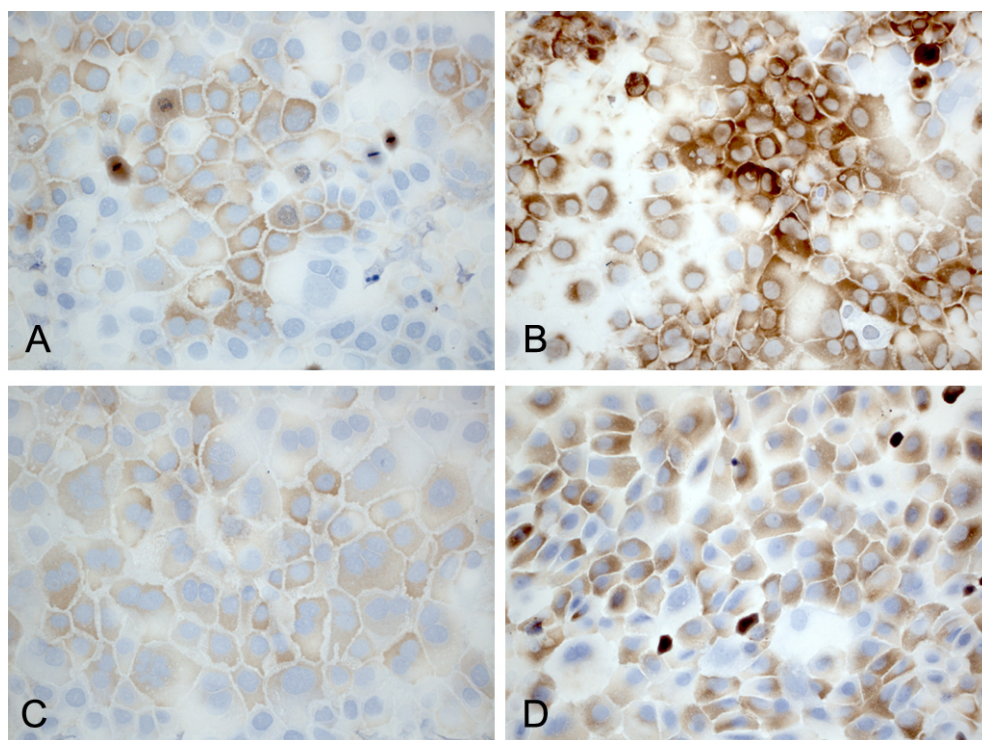


Figura 15-Detecção imunocitoquímica da enzima FAS nas linhagens SCC-4 **(A)**, SCC-9 **(B)**, SCC-15 **(C)** e SCC-25 **(D)**. Observam-se células positivas para FAS com marcação citoplasmática em todas as linhagens, sendo a coloração às vezes mais intensa na região perinuclear. A maior positividade foi detectada na linhagem SCC-9 **(B)**, seguida pela SCC-25 **(D)** (aumento original: 200x).

5.4. Produção de RA, EGF, EGFR e c-erb-B2 pelas células SCC

A Figura 16 mostra um experimento de western blotting para detecção de RA na linhagem SCC-4, no qual foram usados como controles positivos extratos protéicos feitos a partir de fibroblastos gengivais em cultura (linhagem FGH 4) ou de próstata e testículos de rato. Neste ensaio, aproximadamente sessenta microgramas de proteínas destas amostras foram separados em géis de poliacrilamida-SDS a 6%, transferidos para membranas de nitrocelulose, incubados com anticorpos contra RA e as reações reveladas por quimioluminescência. Uma quantidade baixa deste receptor foi evidenciada nas células SCC-4 enquanto que fortes bandas foram detectadas nas amostras dos controles positivos (Figura 16). Uma comparação da expressão da proteína RA entre as células SCC está mostrada na Figura 17 A. Quantidades muito baixas de RA foram encontradas nas linhagens SCC-4, -9 e -15, ao passo que células SCC-25 não produzem RA ou o fizeram em quantidades abaixo do limite de sensibilidade desta técnica (Figura 17A).

A expressão de EGFR e de c-erb-B2 foi também avaliada por experimentos de western blotting, nos quais grandes quantidades de EGFR foram detectadas nas quatro linhagens, sendo que as células SCC-4 e -15 apresentaram bandas bem mais intensas que as SCC-9 e -25 (Figura 17 B). Na linhagem SCC-25, observou-se a presença de uma segunda banda, de massa molecular menor e intensidade mais fraca, que provavelmente corresponde a uma forma de EGFR mutada (EGFR vIII) e constitutivamente ativada, que também pode ser

reconhecida pelos anticorpos primários usados neste estudo (Figura 17 B). Nas reações imunocitoquímicas, observou-se uma maior positividade para EGFR nas linhagens SCC -4 e -15 (Figura 18), achados concordantes com os resultados dos ensaios de western blotting. Nestas linhagens (SCC -4 e -15), observamos forte positividade na membrana celular bem como uma marcação com aspecto granular no citoplasma, algumas vezes sobreposta ao núcleo, sendo portanto difícil determinar a localização exata do receptor, se no citoplasma (internalizado para proteólise pelo sistema ubiquitina-proteossomo) ou na superfície externa da membrana celular. Por outro lado, as células SCC -9 e -25 exibiram um padrão de marcação diferente, com positividade predominante na membrana celular (Figura 18) e eventuais granulações no citoplasma, principalmente na SCC-9. A SCC-25 mostrou marcação intensa e exclusivamente de membrana (Figura 18).

Nas reações de western blotting para c-erb-B2 foram detectadas bandas fortes e com intensidades semelhantes nas linhagens SCC-4, -9 e -15 e uma expressão menor nas células SCC-25 (Figura 17 C). A análise da distribuição desta proteína através de imunocitoquímica mostrou positividade citoplasmática (Figura 19). Estes resultados foram também comparáveis aos de western blotting, nos quais a expressão de c-erb-B2 nas células SCC-4, -9 e -15 foi semelhante, sendo menos intensa na SCC-25, em comparação com as outras linhagens (Figura 19).

A expressão do fator de crescimento EGF pelas linhagens SCC foi estudada somente por imunocitoquímica, pois devido à sua pequena massa molecular (6 kDa) torna-se difícil sua observação através de técnicas

convencionais de eletroforese de proteínas. As células positivas apresentaram marcação citoplasmática e estavam presentes em todas as linhagens, embora uma marcação mais intensa tenha sido observada na linhagem SCC-25 (Figura 20).

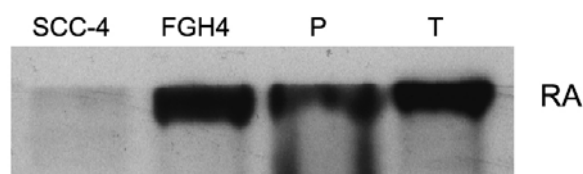


Figura 16 – Reação de western blotting para detecção de RA na linhagem SCC-4 utilizando como controles positivos extratos protéicos de testículos (**T**) e próstata (**P**) de rato e fibroblastos gengivais humanos da linhagem FGH 4. Pouco RA foi observado na linhagem SCC-4, enquanto que grandes quantidades deste receptor foram encontradas nas amostras dos controles positivos.

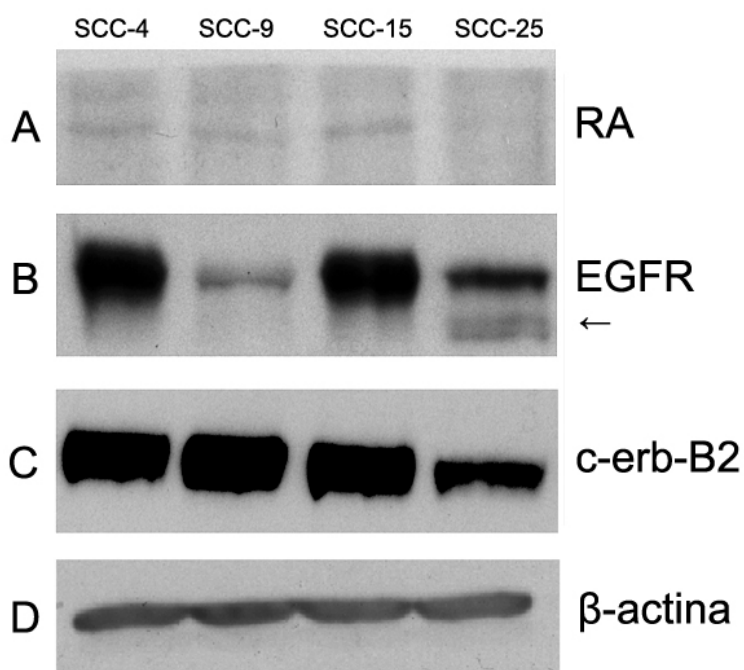


Figura 17- Reações de western blotting para detecção de RA (**A**), EGFR (**B**), c-erb-B2 (**C**) e β -actina (**D**) nas linhagens SCC-4,-9,-15 e -25. Em **A** nota-se a presença de quantidades mínimas de RA nas células SCC-4, -9, -15 e ausência de RA na -25. Em **B** encontramos grandes quantidades do receptor EGFR nas linhagens SCC-4 e -15. Nos extratos protéicos das células SCC-25 observou-se a presença de uma segunda banda mais fraca e de massa molecular menor (seta), que provavelmente corresponde a uma forma de EGFR mutada (EGFR VIII). Nas reações para c-erb-B2 (**C**) nota-se a presença de fortes bandas com intensidades semelhantes nas linhagens SCC-4, -9 e -15 e uma reação mais fraca nas células SCC-25 (**D**) Reação com o anticorpo anti- β -actina para comprovar a presença de quantidades semelhantes de proteína em cada canaleta.

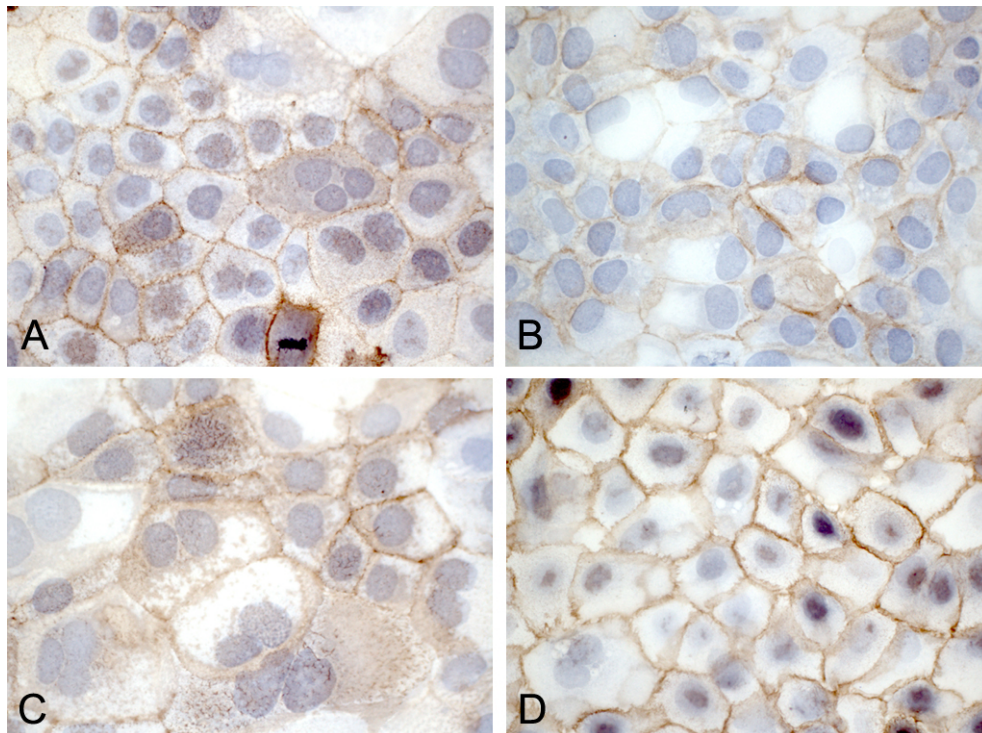


Figura 18- Reações imunocitoquímicas para detecção de EGFR nas células SCC-4 (A), SCC-9 (B), SCC-15 (C) e SCC-25 (D). Observa-se uma maior positividade para o receptor nas linhagens SCC-4 (A) e SCC-15 (C), com marcação da membrana citoplasmática e presença de granulações no citoplasma. Marcação predominantemente de membrana foi observada nas linhagens SCC-9 (B) e SCC-25 (D) (aumento original: 400x).

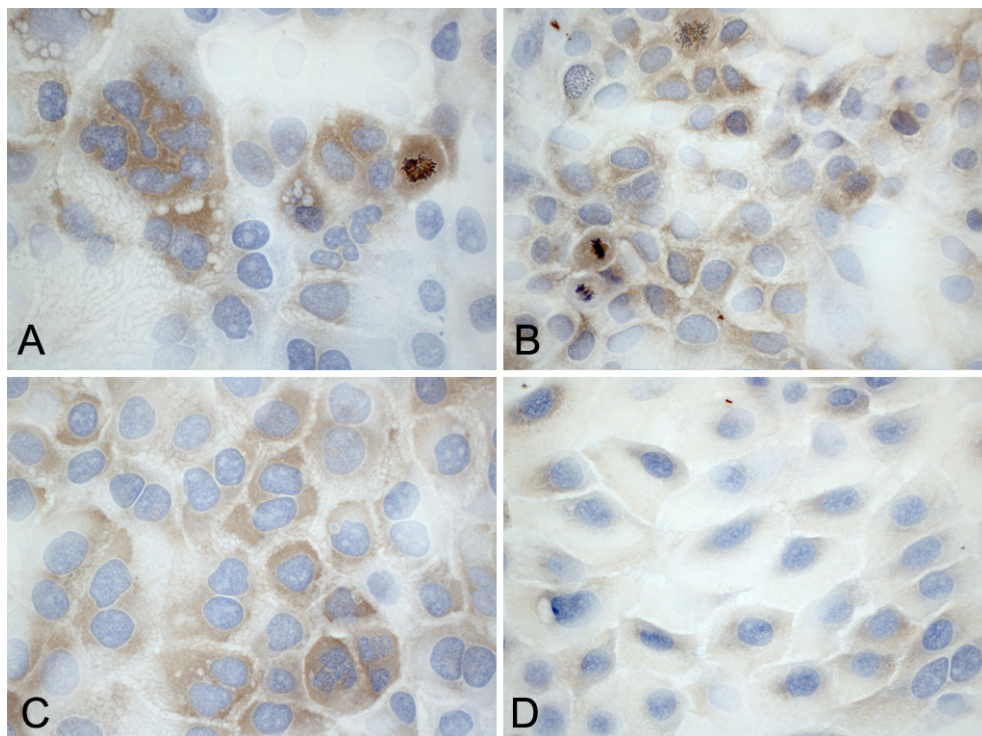


Figura 19- Distribuição da proteína c-erb-B2 nas células SCC-4 **(A)**, SCC-9 **(B)**, SCC-15 **(C)** e SCC-25 **(D)** detectada através de imunocitoquímica. Observa-se um padrão de marcação citoplasmático nas quatro linhagens. A intensidade de marcação foi semelhante nas linhagens SCC-4 **(A)**, -9 **(B)** e -15 **(C)**, sendo as reações menos intensas na SCC-25 (aumento original: 400x).

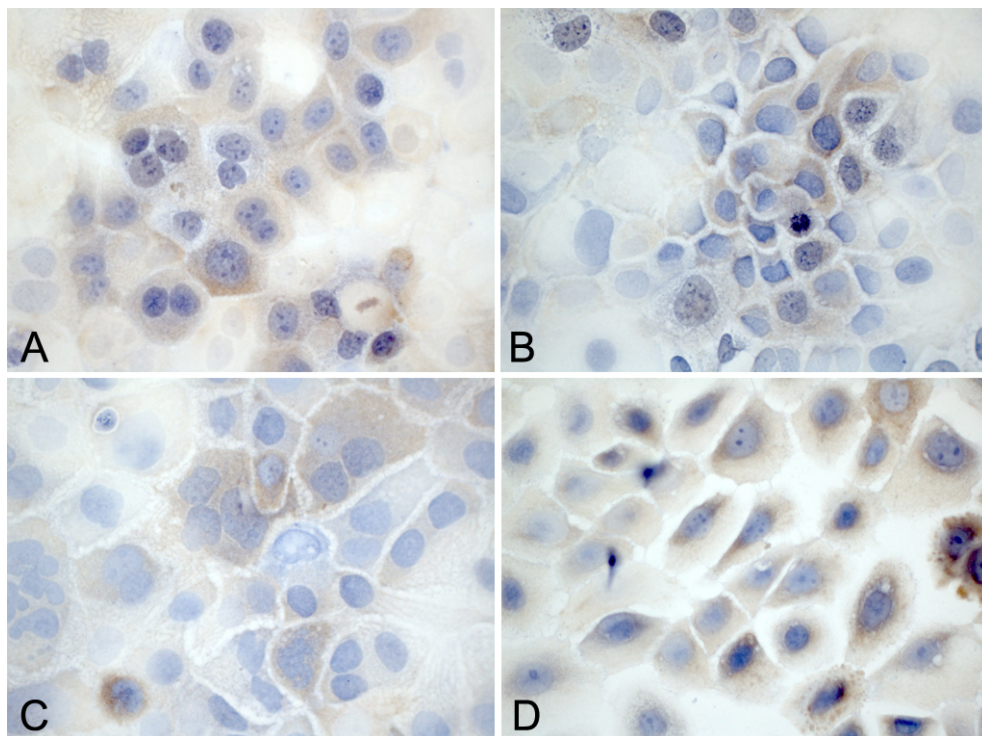


Figura 20- Expressão de EGF pelas células SCC-4 **(A)**, SCC-9 **(B)**, SCC-15 **(C)** e SCC-25 **(D)**. Observa-se maior intensidade da reação na linhagem SCC-25 (aumento original: 400x).

5.5. Efeito da inibição da atividade de FAS na proliferação das células SCC

No intuito de verificar se a atividade de FAS é importante para a proliferação das células SCC, selecionamos a linhagem SCC-9, a qual apresentou a maior expressão de FAS nos experimentos de RT-PCR, western blotting e imunocitoquímica, para o tratamento com o inibidor específico e natural da FAS, a cerulenina. Estas células foram então cultivadas em meio DMEM/F-12 com 10% de FBS na presença de 5 µg/ml de cerulenina ou de quantidades equivalentes de DMSO (utilizado como solvente) e contadas em intervalos de 48 horas, num total de 192 horas. Este experimento mostrou que, em comparação com o grupo controle, as células do grupo tratado com cerulenina tiveram uma significativa inibição da atividade proliferativa (Figura 21), sugerindo que a síntese endógena de ácidos graxos é essencial para a sua proliferação.

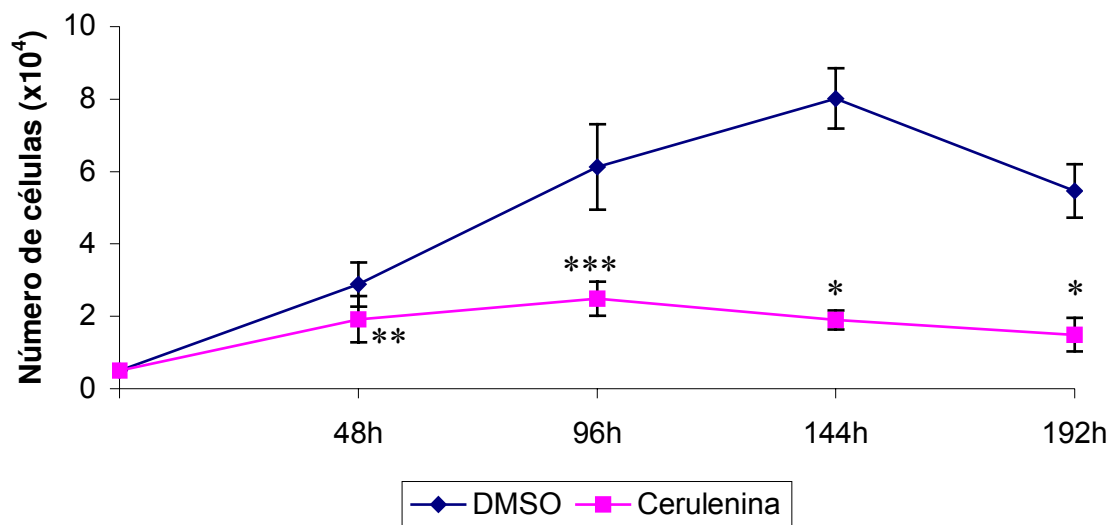


Figura 21- Inibição da proliferação das células SCC-9 pelo tratamento com cerulenina. As células foram cultivadas na presença de 5 $\mu\text{g/ml}$ de cerulenina ou de quantidades equivalentes de DMSO por 192h. A inibição da atividade de FAS provocou significativa redução no crescimento celular em todos os períodos analisados (Mann-Whitney: * $p < 0,001$; ** $p = 0,017$; *** $p = 0,002$).

5.6. Efeito do tratamento com EGF exógeno na produção de FAS e na proliferação das células SCC

Os resultados deste trabalho mostram uma baixa expressão de RA e alta expressão de EGFR nas quatro linhagens SCC. Considerando-se os dados existentes na literatura mostrando que EGF estimula a expressão de FAS em células derivadas de carcinoma prostático humano (LNCaP), decidiu-se verificar se EGF teria algum efeito no controle da produção desta enzima nas células SCC. Para isto, células SCC-15 (com baixa produção relativa de FAS) e -9 (linhagem que mais produziu FAS) foram expostas a 150 ng/ml de EGF exógeno em meio DMEM/F-12 contendo 0,5% de FBS, sendo a expressão de FAS, c-erb-B2 e EGFR analisadas através de western blotting e a proliferação estudada através de contagem automática de células. Como pode ser observado na Figura 22, o tratamento com EGF exógeno promoveu uma nítida redução da quantidade da proteína FAS nos extratos protéicos, tanto após 12 como 24 horas de incubação. Os níveis de EGFR foram também bastante reduzidos após os mesmos períodos de tratamento, enquanto que uma discreta diminuição da quantidade de c-erb-B2 pôde ser observada nas células tratadas com EGF (Figura 22). A redução na quantidade de EGFR nos extratos celulares provenientes de células tratadas com EGF sugere que este receptor foi degradado pelo sistema ubiquitina-proteossomo após sua ligação com EGF e posterior internalização, fenômeno este descrito na literatura em células de CECs bucais por NOURI *et al.* (2000) e em outros modelos experimentais, como as células epiteliais de rim de macaco verde africano (COS-1) (LONGVA *et al.*, 2002).

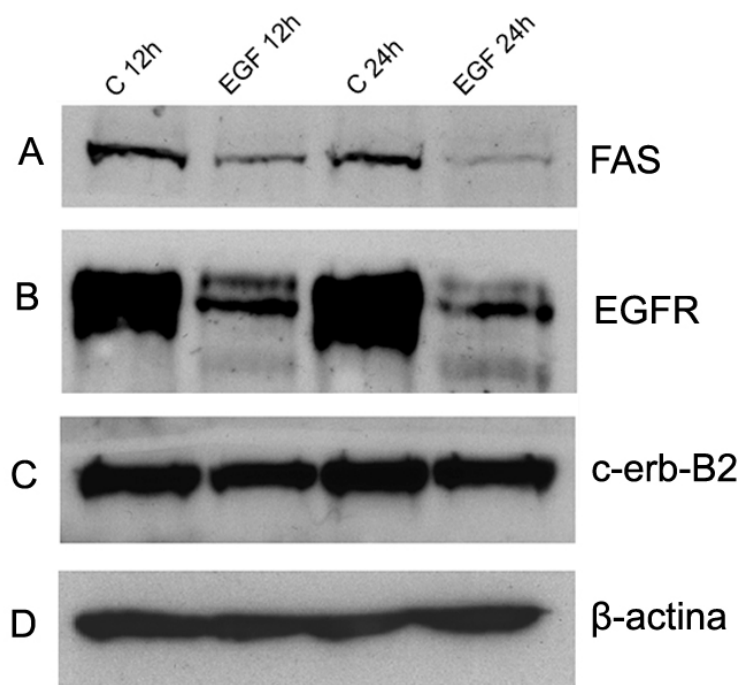


Figura 22 - Efeito do tratamento com 150 ng/ml de EGF sobre as quantidades das proteínas FAS, EGFR e c-erb-B2 nos extratos celulares de células SCC-9. O tratamento com EGF produziu uma clara redução nos níveis de FAS (**A**) e de EGFR (**B**), nos períodos de 12 e 24 horas de incubação. Uma discreta diminuição nos níveis de c-erb-B2 (**C**) nos mesmos períodos foi também observada. (**D**) western blotting com anticorpos primários contra β -actina, usado para verificar se a quantidade de proteínas aplicada em cada canaleta foi equivalente. O resultado dos experimentos com as células SCC-15 foi o mesmo.

As células da linhagem SCC-9 foram a seguir semeadas em placas de 24 poços e incubadas em meio DMEM/F-12 contendo 0,5% de FBS mais 150 ng/ml de EFG e incubadas por um período de 192 horas. Em intervalos de 48 horas, estas foram tripsinizadas e contadas em contador automático. A Figura 23 mostra que quando sob a ação do EGF exógeno as células SCC 9 proliferam menos que as células controle, o que também ocorreu no grupo submetido a tratamento com 5 µg/ml de cerulenina.

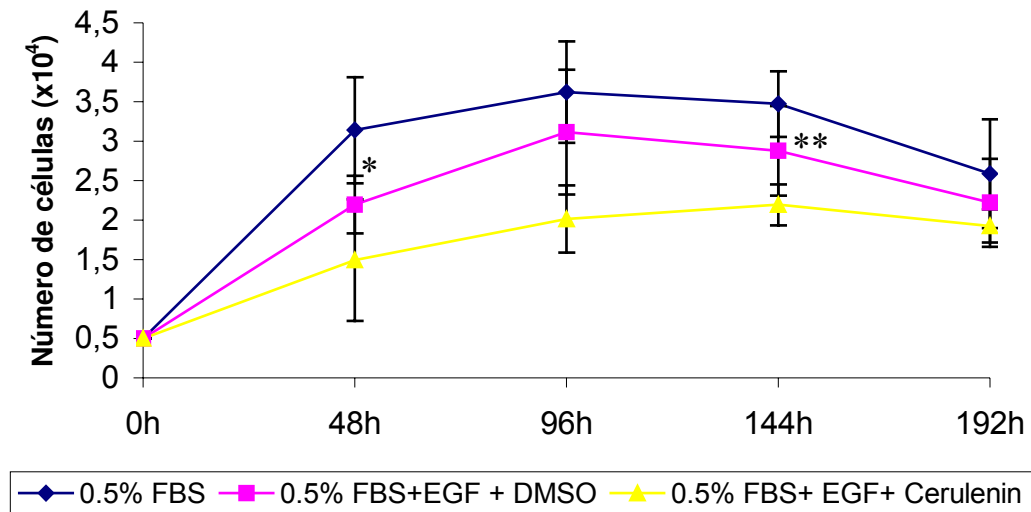


Figura 23- Efeito do EGF na proliferação da linhagem SCC-9. Culturas foram expostas a 150 ng/ml de EGF, tripsinizadas e as células contadas em contador automático. As células dos grupos tratados com EGF apresentaram inibição do crescimento em comparação com o grupo controle (0,5% FBS). Observa-se maior inibição para o grupo tratado com EGF e cerulenina (Mann-Whitney: * $p=0,002$; ** $p=0,022$).

6. DISCUSSÃO

Um crescente número de trabalhos recentes da literatura vem comprovando a idéia relativamente antiga de que a síntese lipídica seria um fator vital para a sobrevivência das células malignas, conferindo ainda uma vantagem proliferativa a estas. De fato, FAS, a enzima anabólica que sintetiza os ácidos graxos endógenos, está presente em grandes quantidades em diversas neoplasias malignas humanas (EPSTEIN *et al.*, 1995; PIZER *et al.*, 1996a; PIZER *et al.*, 1996b; SHUBARJI *et al.*, 1996; MILGRAUM *et al.*, 1997; RASHID *et al.*, 1997; SWINNEN *et al.*, 1997; PIZER *et al.*, 1998b; VISCA *et al.*, 1999; VLAD *et al.*, 1999; ALO *et al.*, 2000; OSKOUIAN, 2000; PIYTHILAKE, 2000; SWINNEN *et al.*, 2000; BULL *et al.*, 2001; DHANASEKARAN *et al.*, 2001; NEMOTO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001; WELSH *et al.*, 2001; KUSAKABE *et al.*, 2002; SWINNEN *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2003; INNOCENZI *et al.*, 2003; TAKAHIRO *et al.*, 2003; VISCA *et al.*, 2003), dentre as quais incluem-se os CECs bucais (KRONTRIRAS *et al.* 1999; SILVA *et al.*, 2003). A expressão da proteína FAS tem sido ainda considerada como um marcador para o prognóstico de alguns destes tumores, como o câncer de próstata (EPSTEIN *et al.*, 1995), de mama (ALO *et al.*, 1996), de ovário (GANSLER *et al.*, 1997; ALO *et al.*, 2000), de colon (VISCA *et al.*, 1999), o melanoma (INNOCENZI *et al.*, 2003) e também sarcomas de tecidos moles (TAKAHIRO *et al.*, 2003). De acordo com BARON *et al.* (2003), tumores que expressam grandes quantidades de FAS apresentam um comportamento biológico mais agressivo comparado com aqueles que apresentam níveis normais, pois a

atividade desta enzima proporciona uma vantagem seletiva para o crescimento celular. Um estudo recente de análise da expressão gênica em larga escala confirma, de certa forma, esta hipótese. Neste trabalho, a comparação por “microarrays” entre o padrão de expressão gênica das metástases e das respectivas lesões primárias de diversas neoplasias revelou um grupo de genes associados ao processo metastático, dentre os quais se encontra a FAS (RAMASWAMY *et al.*, 2003). Diversos estudos mostram que inibidores específicos da atividade de FAS são capazes de inibir a proliferação celular, através do bloqueio da síntese de DNA durante a fase S, o que leva posteriormente as células a morte por apoptose (FURUYA *et al.*, 1997; PIZER *et al.*, 1998b; LI *et al.*, 2001). Embora muito recentemente SWINNEN *et al.* (2003) tenham mostrado que a atividade de FAS é necessária para a produção dos fosfolipídios incorporados nas membranas das células da linhagem de câncer de próstata LNCaP, o mecanismo biológico envolvido na comunicação entre a progressão do ciclo celular e a biossíntese de lipídios é ainda completamente desconhecido. Estes mesmos autores sugerem, no entanto, que fosfolipídios presentes em microdomínios da membrana podem ativar cascatas de sinalização intracelular, as quais poderiam estimular a proliferação. Desta maneira, o metabolismo de ácidos graxos tem sido apontado por muitos pesquisadores como um promissor alvo para a terapia do câncer, principalmente devido a baixa expressão de FAS em tecidos normais e a citotoxicidade seletiva para as células tumorais (KUHAJDA, 2000; KUMAR-SINHA *et al.*, 2003; BARON *et al.*, 2003). A inibição química da atividade de FAS é aparentemente bem tolerada em camundongos adultos e funciona como

inibidor de apetite (LOFTUS *et al.*, 2000; KUMAR *et al.* 2001). Entretanto, a deleção do gene que codifica a proteína FAS (*FASN*) é letal e provoca a morte dos embriões antes mesmo da implantação destes no útero, sugerindo que terapias baseadas no bloqueio da atividade desta enzima possam apresentar graves efeitos teratogênicos (CHIRALA *et al.*, 2003). Já a inibição de FAS preferencialmente nos tecidos neoplásicos está sendo estudada no laboratório do Dr. Massimo Loda, no Dana-Farber Cancer Institute (Harvard Medical School, Boston, E.U.A.). Este grupo mostrou recentemente que a proteína FAS pode ser degradada pelo sistema ubiquitina-proteossomo e identificou a enzima responsável pela remoção das suas etiquetas de ubiquitina, denominada de USP2. USP2, por sua vez, tem expressão também aumentada no câncer de próstata, no qual atua prolongando a meia-vida da proteína FAS (GRANER *et al.*, 2003). Estes autores sugerem que USP2 pode ser um melhor alvo terapêutico que a própria FAS, caso FAS seja o único substrato para esta enzima desubiquitinante.

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens celulares derivadas de CECs bucais SCC-4, -9, -15 e -25 para investigar uma possível participação da FAS na patogênese do CEC bucal. Através de experimentos de RT-PCR, de western blots e de reações imunocitoquímicas, pôde-se observar que FAS é expressa nas quatro linhagens, porém em quantidades diferentes. As linhagens que apresentaram as maiores quantidades tanto de RNAs mensageiros para FAS como da proteína FAS foram a SCC-9 e -25. O aumento da produção desta enzima em displasias epiteliais e CECs humanos de língua, em relação ao epitélio

adjacente morfológicamente normal, foi relatado pela primeira vez por KRONTIRAS *et al.*, em 1999. Em concordância com os achados destes autores, um estudo recente realizado na Disciplina de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP mostrou que FAS é expressa em 78% dos casos de uma amostra de 62 CECs da região de cabeça e pescoço, principalmente nas lesões microscopicamente bem diferenciadas (SILVA *et al.*, 2003). Além do mais, a expressão de FAS, que no epitélio normal está restrita as camadas celulares inferiores, passa a ser encontrada em todas as células da camada espinhosa nos casos de displasia epitelial moderada ou severa (SILVA *et al.*, 2003). Reforçando a importância da síntese de ácidos graxos na patogênese dos CECs bucais, GUO *et al.* (2000), mostraram que esta atividade é mais alta em amostras teciduais de CECs bucais do que a que em amostras de áreas adjacentes ao tumor ou de mucosa bucal clinicamente normal. Estes mesmos autores (GUO *et al.*, 2003) demonstraram ainda haver inibição da síntese de ácidos graxos em fragmentos de tecido de CECs bucais após tratamento com cerulenina, o que ocorreu também em amostras de mucosa clinicamente normal, porém em menor extensão.

Os inibidores específicos da atividade da FAS, incluindo o produto natural cerulenina e o composto sintético c75, causam diminuição da síntese de ácidos graxos e inibição da síntese de DNA com conseqüente bloqueio da progressão para a fase S do ciclo celular, o que acaba por induzir a morte por apoptose em células de carcinoma de colon (HCT 116 e RKO), de leucemia pré-mielocítica (HL 60) e de carcinoma de mama (MCF-7) (FURUYA *et al.*, 1997; PIZER *et al.*, 1996a; PIZER *et al.*, 1998b; LI *et al.*, 2001). No entanto, o

mecanismo através do qual a inibição de FAS desencadeia a apoptose ainda não está claro, apesar de ter sido sugerido que o acúmulo do intermediário metabólico malonil-CoA poderia mediar este fenômeno (PIZER *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001; THUPARI *et al.*, 2001). Os resultados do presente trabalho mostram, pela primeira vez, que o bloqueio da atividade de FAS inibe significativamente a proliferação de células derivadas de CECs bucais (Figura 21). Estes corroboram os dados já publicados na literatura, indicando que um alto metabolismo de lipídios é essencial para a proliferação de células cancerosas (FURUYA *et al.*, 1997; PIZER *et al.*, 1998b; PIZER *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001).

Os experimentos deste trabalho sugerem que exista uma correlação entre proliferação celular e os níveis tanto de RNAs mensageiros como da proteína FAS nas células SCC. Curiosamente, a linhagem que apresentou os mais altos níveis de FAS foi a SCC-9, cujo potencial proliferativo não foi significativamente diferente das linhagens SCC-4 e -15, as quais mostraram uma menor expressão desta enzima. Entretanto, a linhagem SCC-25, que exibiu um índice de proliferação muito maior do que as outras três (nas curvas de proliferação, no índice mitótico e nas reações imunocitoquímicas para os marcadores Ki-67 e PCNA), apresentou também elevada expressão de FAS, embora em quantidades menores do que a SCC-9. Isto não é difícil de entender, tendo-se em vista que os experimentos aqui apresentados descrevem o comportamento de quatro linhagens celulares tumorais, as quais provavelmente acumulam alterações genéticas oriundas das lesões a partir das quais tiveram origem e do próprio subcultivo no laboratório. Por exemplo, uma segunda banda,

com massa molecular menor, foi observada em todos os experimentos de westerns blotting para detecção de receptor EGFR na linhagem SCC-25. Esta banda corresponde, provavelmente, a uma forma mutada de EGFR, denominada de EGFRvIII, com cerca de 145 kDa. Esta forma mutante do receptor EGFR pode ser reconhecida pelos anticorpos utilizados neste trabalho e é constitutivamente ativada (WIKSTRAND *et al.*, 1995; OKAMOTO *et al.*, 2003). Portanto, sua presença poderia ser uma das explicações para a vantagem proliferativa da SCC-25 sobre as outras três linhagens. De acordo com OKAMOTO *et al.* (2003), alterações no gene que codifica EGFR podem ser tão importantes quanto alterações na sua expressão, sendo a variante EGFRvIII (também conhecida como Δ EGFR ou de2-7 EGFR) uma das mutações mais comuns, caracterizada pela deleção dos exons 2-7. A freqüente expressão de EGFRvIII em diversos tumores humanos, sugere que esta molécula confere uma vantagem de crescimento para células tumorais *in vivo*.

De acordo com KUHAJDA (2000), em tumores que respondem a hormônios, estrógeno, progesterona e andrógenos regulam a expressão de FAS. Está bem estabelecido que progesterona aumenta os níveis de RNAs mensageiros de FAS em células de câncer de mama (LACASA *et al.*, 2001), enquanto que andrógenos e fatores de crescimento, como o EGF, estimulam tanto a produção como a atividade de FAS em células derivadas de carcinomas de próstata (SWINNEN *et al.*, 1997b; SWINNEN *et al.*, 2000). No entanto, FAS também é altamente expressa em tumores de próstata andrógeno-independentes (PIZER *et al.*, 2001; MYERS *et al.*, 2001) e em metástases ósseas deste tipo de

tumor (ROSSI *et al.*, 2003). A expressão de FAS induzida por hormônios ou por EGF ocorre através de SREBP-1, a qual desempenha um importante papel no controle da expressão de genes lipogênicos (BROWN & GOLDSTEIN, 1997). De acordo com HEEMERS *et al.* (2001) e SWINNEN *et al.* (2002), andrógenos estimulam a expressão de RNAs mensageiros para SREBP, aumentando a quantidade da forma ativa deste fator de transcrição no núcleo. O mecanismo de regulação da síntese de ácidos graxos em células de CECs bucais não é conhecido. Neste trabalho, os resultados obtidos através de experimentos de western blotting revelaram que a produção de RA é muito baixa nas células SCC-4, -9 e -15 e ausente na linhagem SCC-25, a qual tem o maior potencial proliferativo. Por outro lado, EGFR e c-erb-B2 são altamente expressos por estas linhagens celulares, sugerindo um possível papel para seus ligantes no controle da expressão de FAS. Isto faz sentido se considerarmos que tanto EGFR como c-erb-B2 tem sido implicados na patogênese dos CECs bucais (O-CHAROENRAT *et al.*, 2000; BEI *et al.*, 2001; O-CHAROENRAT *et al.*, 2002a; HOLBRO *et al.*, 2003).

Vários tipos de neoplasias malignas humanas de origem epitelial, incluindo os CECs bucais, apresentam amplificação gênica ou alta expressão de EGFR (GRANDIS & TWEARDY, 1993; KUTTAN & BHAKTHAN, 1997; ISHITOYA *et al.*, 1989; KYIOTA *et al.*, 2000). Alguns autores correlacionam a expressão elevada de EGFR com um pobre prognóstico em pacientes com CEC bucal, sugerindo que um aumento da quantidade deste receptor pode desempenhar papel importante na progressão tumoral (SARANATH *et al.*, 1992; YAMADA *et al.*, 1992; DASSONVILLE *et al.*, 1993). Expressão aumentada de c-erb-B2 é também

um evento freqüente em CECs bucais (HOU *et al.*, 1992; IBRAHIM *et al.*, 1997; XIA *et al.*, 1997; WILKMAN *et al.*, 1998; KUROPKAT *et al.*, 2002), podendo, de acordo com alguns autores, estar associada com um tempo de sobrevida mais curto e utilizada como fator prognóstico (HOU *et al.*, 1992; WERKMEISTER *et al.*, 1996; IBRAHIM *et al.*, 1997; XIA *et al.*, 1997; O-CHAROENRAT *et al.*, 1999; XIA *et al.*, 1999; KUROPKAT *et al.*, 2002). Entretanto, este tipo de correlação não foi encontrada por outros autores (FIELD *et al.*, 1992; NAGLER *et al.*, 2002; KHAN *et al.*, 2002).

KUMAR-SINHA *et al.* (2003) descreveram recentemente que c-erb-B2 estimula o promotor da FAS e conseqüentemente a síntese de ácidos graxos em uma linhagem celular de câncer de mama. No mesmo trabalho, estes autores demonstraram que a inibição da FAS promove morte por apoptose preferencialmente nas células que expressam grandes quantidades de c-erb-B2. Os receptores da família erb-B, quando ativados, desencadeiam sinais intracelulares devido a sua atividade de tirosina-quinase, que podem ativar as vias PI-3K e MAP quinase (TSANG & CROWE, 1999; O-CHAORENRAT *et al.*, 2002a; KUMAR-SINHA *et al.*, 2003). Neste contexto, foi demonstrado por YANG *et al.* (2002) que a expressão forçada do oncogene H-ras em células MCF-10 (derivadas de câncer de mama) promove um aumento da expressão de FAS, o qual é mediado pela ativação de PI-3K e das MAP quinases, que terminam por ativar SREBP1. De acordo com BARON *et al.* (2003), o efeito oncogênico da ativação da via PI-3K pode ser mediado, ao menos em parte, pela indução da expressão de FAS. VAN DE SANDE *et al.* (2002) demonstraram que a inativação

do gene supressor tumoral PTEN e a subsequente ativação da via PI-3K/Akt pode causar aumento na expressão de FAS em células derivadas de câncer de próstata. O oncogene c-erb-B2 foi descrito como um fator de sobrevivência para células de câncer de próstata em ambientes com depleção de andrógenos (SIGNORETTI *et al.*, 2000) e a expressão forçada de c-erb-B2 em células de câncer de próstata também ativa as vias das MAP quinases e PI3K/AKT (CRAFT *et al.*, 1999; YEH *et al.*, 1999; WEN *et al.*, 2000). Portanto c-erb-B2 desempenha aparentemente um papel na restauração das funções do RA em células de câncer de próstata, na ausência de testosterona (LIN *et al.*, 2003).

É provável que, nas linhagens celulares derivadas de CECs bucais utilizadas neste trabalho, a regulação da expressão gênica da FAS seja mediada por EGF, através dos receptores c-erb-B2 ou EGFR, levando a ativação de SREBP. EGF exógeno apresenta um efeito bifásico sobre linhagens celulares de CECs, pois concentrações picomolares deste fator de crescimento são mitogênicas e concentrações nanomolares não apresentam efeito mitótico ou mesmo inibem o crescimento celular (KONGER & CHAN, 1993; O-CHAROENRAT *et al.*, 1999). As reações imunocitoquímicas mostradas no presente estudo foram positivas para EGF, principalmente na linhagem SCC-25, sugerindo uma indução tipo autócrina do crescimento celular. De acordo com uma extensa revisão da literatura publicada por O-CHAROENRAT (2002a), vários ligantes para os receptores da família erb-B podem modular a proliferação, invasão ou a expressão de metaloproteinases de matriz em CECs de cabeça e pescoço. Segundo estes autores, os RNAs mensageiros para EGF são expressos em grandes quantidades

por linhagens celulares derivadas destas neoplasias. No intuito de entender o papel do EGF na regulação da produção de FAS nas células SCC, optou-se, no presente trabalho, por expor as linhagens SCC-9 e -15 (que apresentaram altos e baixos níveis de FAS, respectivamente) a altas concentrações deste fator de crescimento. Como mencionado anteriormente, concentrações nanomolares podem inibir o crescimento de células escamosas em cultura. De fato, a quantidade da proteína FAS foi substancialmente reduzida por este tratamento, assim como os níveis protéicos de EGFR, os quais foram drasticamente diminuídos nos mesmos períodos, devido a sua internalização, ubiquitinação e conseqüente degradação pelos proteossomos (MIMNAUGH *et al.*, 1996; NOURI *et al.*, 2000; LONGVA *et al.*, 2002). Houve também uma ligeira redução nas quantidades de c-erb-B2, sugerindo sua participação no processo de sinalização celular desencadeado por EGF. Estes resultados podem explicar, ao menos em parte, o efeito inibitório de altas concentrações de EGF no crescimento de células derivadas de CECs, o que foi confirmado no presente estudo (Figura 23). O tratamento com EGF também inibe a lipogênese e a proliferação de hepatócitos de ratos em culturas primárias (GELDERBLOM *et al.*, 1999) e suprime a lipogênese nas células das glândulas sebáceas de hamster (SATO *et al.*, 2001; AKIMOTO *et al.*, 2002). Estes achados reforçam a idéia de que o metabolismo de lipídios é importante para a proliferação, pois o EGF, além de provocar diminuição da quantidade de FAS nas células SCC, também foi capaz de inibir o crescimento celular.

Apesar do grande número de evidências experimentais e clínicas apontando FAS como uma molécula importante na patogênese de neoplasias malignas, experimentos recentemente realizados no Laboratório de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP sugerem que o mesmo possa ocorrer em processos proliferativos de natureza não neoplásica. Fibroblastos isolados de uma doença genética humana chamada Fibromatose Gengival Hereditária, caracterizada por um crescimento lento e contínuo do tecido gengival, também expressam grandes quantidades de FAS e têm a sua proliferação bloqueada pelo tratamento com cerulenina (¹ALMEIDA *et al.*, 2003). Portanto, mais estudos se fazem necessários para uma melhor compreensão da participação de FAS na patogenia de neoplasias malignas, em particular os CECs bucais.

¹ ALMEIDA, J. P.; SILVA, S. D.; VARGAS, P. A.; COLETTA, R. D.; LODA, M.; GRANER, E. Androgen driven fatty acid synthase expression up regulates the proliferation of fibroblasts isolated from hereditary gingival fibromatosis. Em fase de elaboração.

7. CONCLUSÕES

1. A enzima FAS é diferencialmente produzida pelas linhagens SCC-4, -9, -15 e -25, sendo as maiores quantidades encontradas nas linhagens SCC-9 e -25.
2. As células SCC expressam quantidades muito baixas de RA.
3. A produção da proteína EGFR é mais alta nas células das linhagens SCC-4 e -15 do que nas células SCC-9 e -25, ao passo que c-erb-B2 é expresso em maiores quantidades nas linhagens SCC-4, -9 e -15 do que na SCC-25.
4. A enzima FAS desempenha um papel essencial para a proliferação das células SCC, pois sua inibição com cerulenina reduz significativamente o crescimento celular.
5. O fator de crescimento EGF, em altas concentrações, promove a redução da quantidade da proteína FAS bem como inibe a proliferação das células SCC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS²

AKIMOTO, N.; SATO, T.; SAKIGUCHI T.; KITAMURA, K.; KOHNO, Y.; ITO, A. Cell proliferation and lipid formation in hamster sebaceous gland cells. *Dermatology*, v. 204, n. 2, p. 118-123, 2002.

ALO', P. L.; VISCA, P.; MARCI, A.; MANGONI, A.; BOTTI, C.; DI TONDO, U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer*, v. 77, n. 3, p. 474-482, 1996.

ALO' , P. L.; VISCA, P.; FRAMARINO, M. L.; BOTTI, C.; MONACO, S.; SEBASTIANI, V.; SERPIERI, D. E.; DI TONDO, U. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep*, v. 7, n. 6, p. 1383-1388, 2000.

BARON, A.; MIGITA, T.; TANG, D.; LODA, M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*, in press.

BARTLETT, J.; MALLON, E.; COOKE, T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J Pathol* , v. 199, n. 4, p. 411-417, 2003.

BASSALYK, L. S.; FALILEEV, G. V, KUSHINSKII, N. E., NAGIBIN, A. A. Cytoplasmic receptors of steroid sex hormones in malignant tumors and precancerous processes of the human oral mucosa. *Vopr Onkol*, v. 33, n. 1, p.28-30, 1987.

BEI, R.; POMPA, G.; VITOLO, D.; MORICONI, E.; CIOCCI, L.; QUARANTA, M.; FRATI, L.; KRAUS, M. H.; MURARO, R. Co-localization of multiple ErbB receptors

² Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*, v. 195, n. 3, p. 343-348, 2001.

BERGLER, W.; PETROIANU, G.; JUNCKER, C.; HORMANN, K.. Correlation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in oropharyngeal carcinomas. *Acta Otolaryngol Stockholm*, v. 116, n. 3, p. 486-489, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 448-454, 1976.

BRIGGS, M. R.; YOKOYAMA, C.; WANG, X.; BROWN, M. S.; GOLDESTINE, J. L. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promotor. I. Identification of the protein and delination of its target nucleotide sequence. *J. Biol. Chem*, v. 268, n. 19, p.14490-14496, 1993.

BRINK, J.; LUDTKE, S. T.; YANG, CHAO-YUH; GU, ZEI-WEI; WAKIL, S. J.; CHIU, W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by elctron cryomicroscopy. *PNAS*, v. 99, n. 1, p. 138-143, 2001.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, v. 89, n. 3, p. 331-340, 1997.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cell and blood. *PNAS*, v. 96, n. 20, p. 11041-11048, 1999.

BULL, J. H.; ELLISON, G.; PATEL, A.; MUIR, G.; WALKER, M.; UNDERWOOD, M.; KHAN, F. PASKINS, L. Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Br J Cancer*, v. 84, n. 11, p. 1512-1519, 2001.

CARLOS DE VICENTE, J.; HERRERO-ZAPATERO, A.; FRESNO, M. F.; LOPEZ-ARRANZ, J. S. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol.*, v. 38, n. 3, p. 301-308, 2002.

CHIRALA, S. S.; JAYAKUMAR, A.; GU, Z-W; WAKIL, S. J. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *PNAS*, v. 98, n. 6, p. 3104-3108, 2001.

CHIRALA, S. S.; CHANG, H.; MATZUK, M.; ABU-ELHEIGA, L.; MAO, J.; MAHON, K.; FINEGOLD, M.; WAKIL, S. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *PNAS*, v. 100, n. 11, p. 6358-6363, 2003.

CONWAY, D. I.; MACPHERSON, L.M; GIBSON, J. BINNIE, V. L. Oral cancer prevention and detection in primary dental healthcare. *Prim Dent Care*, v. 9, n. 4, p. 119-123, 2002.

CRAFT, N.; SHOSTAK, Y.; CAREY, M.; SAWYERS, C. L. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosino kinase. *Nat Med*, v. 5, n. 3, p.280-285, 1999.

DASSONVILLE, O.; FORMENTO, J. L.; FRANCOUAL, M.; RAMAIOLI, A.; SANTINI, M.; SCHNEIDER, F.; DEMAND, F.; DEMANS, G. Expression of

epidermal growth factor receptor and survival in upper aero-digestive tract cancer. *J Clin Oncol*, v. 11, n. 10, p. 1873-1878, 1993.

DE SCHRIJVER, E.; BRUSSELMANS, K.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNC aP prostate cancer cells. *Cancer Res*, v. 63, n. 13, p. 3799-3804, 2003.

DHANASEKARAN, S. M.; BARRETTE, T. R.; GHOSH, D.; SHAH, R.; VARAMBALLY, S.; KURACHI, K.; PIENTA, K. J.; RUBIN, M. A.; CHINNAIYAN, A. M. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, v. 412, n. 6849, p. 822-826, 2001.

DI LEO, A.; DOWSETT, M.; HORTEN, B.; PENAULT-LLORCA, F. Current status of HER2 testing. *Oncology*, v. 63, p. 25-32, 2002.

EISBRUCH, A.; BLICK, M.; LEE, J. S.; SACKS, P. G.; GUTTERMAN, J. Analysis of the epidermal growth factor receptor gene in fresh human head and neck tumors. *Cancer Res*, v. 47, n. 13, p. 3603-3605, 1987.

EPSTEIN, J. I.; CARMICHAEL, M.; PARTIN, A. W. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. *Urology*, v. 45, n. 1, p.81-86, 1995.

ETTENBERG, S. A.; MAGNIFICO, A.; CUELLO, M.; NAU, M. M.; RUBSTEIN, X. R.; YARDEN, A. M.; WEISSMAN, A. M.; LIPKOWITZ, S. cbl-b- dependent coordinated degradation of the epidermal growth factor receptor signaling complex. *J Biol Chem*, v. 276, n. 29, p. 27677-27684, 2001.

FIELD, J. K.; SPANDIDOS, D. A.; YIAGNISIS, M.; GOSNEY, J. R.; PAPADIMITRIOU, K.; STELL, P. M. C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*, v. 12, n. 3, p. 613-619, 1992.

FURUYA, Y.; AKIMOTO, S.; YASUDA, K.; ITO, H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res*, v. 17, n. 6D, p. 4589-4593, 1997.

GABRIELSON, E. W.; PINN, M. L.; TESTA, J.R.; KUHAJDA, F.P. Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma. *Clin Cancer Res.*, v. 7, n. 1, p. 153-157, 2001.

GANSLER, T. S.; HARDMAN, W 3rd; HUNT, D. A.; SCHAFFEL, S.; HENNIGAR, R. A. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol*, v. 28, n. 6, p. 686-692, 1997.

GELDERBLOM, W. C.; ABEL, S.; SMUTS, C. M.; SWANEVELDER, S.; SNYMAN, S. D. Regulation of fatty acid biosynthesis as a possible mechanism for the mitoinhibitory effect of fumonisin B1 in primary rat hepatocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 61, n. 4, p. 225-234, 1999.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H. H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, v. 133, n. 4, p. 1710-1715, 1984.

GOMES, X. V.; BURGERS, P. M. Two modes of FEN1 binding to PCNA regulated by DNA. *Embo J*, v. 19, n. 14, p. 3811-3821, 2000.

GRANDIS, J. R.; TWEARDY, D. J. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of

carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res*, v. 53, n. 15, p. 3579-3584, 1993.

GRANER, E.; TSANG, D.; ROSSI, S.; BARON, A.; MIGITA, T.; WEINSTEIN, J.; LECHPAMMER, M.; HUESKEN, D.; ZIMMERMANN, J.; SIGNORETTI, S.; LODA, M. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, *in press*.

GUO, C. B.; YU, G. Y.; CUI, L. H. et al. Endogenous fatty acid synthesis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 38, n. 5, p. 506-508, 2000.

GUO, C. B.; CUI, N.B.; YU, G. Y.; LIU, D. X.; MENG, S. C.; SONG, Q. Effects of cerulenin on the endogenous fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 61, n. 8, p. 909-912, 2003.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem*, v. 277, n. 29, p. 25847-25850, 2002.

HEEMERS, H.; MAES, B.; FOUFELLE, F.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. Androgen stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cell lines by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol. Endocrinology*, v. 15, n. 10, p. 1817-1828, 2001.

HEEMERS, H.; VANDERHOYDONC, F.; ROSKAMS, T.; SHECHTER, W. H.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues in vivo. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 205, n. 10, p. 21-31, 2003.

HEILIGTAG, S. J.; BREDEHORST, R.; DAVID, K. A. Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. *Cell Death Differ*, v. 9, n. 9, p. 1017-1025, 2002.

HOBISCH, A.; CULIG, Z.; RADMAYR, C.; BARTSCH, G.; KLOCKER, H.; HITTMAIR, A. Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer Res*, v. 55, n. 14, p. 3068-3072, 1995.

HOLBRO, T.; CIVENNI, G.; HYNES, N. E. The erbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research*, v. 284, n. 1, p. 99-110, 2003.

HOU, L.; SHI, D.; TU, S. M.; ZHANG, H. Z.; HUNG, M. C.; LING, D. Oral cancer progression and c-erbB-2/neu proto-oncogene expression. *Cancer Lett.*, v. 65, n. 3, p. 215-220, 1992.

HUANG, W. Y.; COLTRERA, M.; SCHUBERT, M.; MORTON, T.; TRUELOVE, E. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 78, n. 6, p. 748-754, 1994.

IBRAHIM, S.O.; VASSTRAND, E. N.; LIAVAAG, P. G.; JOHANNESSEN, A. C.; LILLEHAUG J. R. Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res.*, v. 17, n. 6D, p. 4539-4546, 1997

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2003. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>>. Acessado em 03 de setembro de 2003.

INNOCENZI, D; ALO, P. L.; BALZANI, A.; SEBASTIANI,V.; SILIPO, V.; LA TORRE, G.; RICCIARDI, G.; BOSMAN, C.; CALVIERI, S. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol*, v. 30, n. 1, p. 23-28, 2003.

ISHITOYA, J.; TORIYAMA, M.; OGUCHI, N.; KITAMURA, K.; OHSHIMA, M.; ASANO, K.; YAMAMOTO, T. Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br. J. Cancer*, v. 59, n. 4, p. 559-562, 1989.

JAYAKUMAR, A.; TAI, M.; HUANG, W.; AL-FELL, W.; HSU, M.; ABU-ELHEIGA, L.; CHIRALA, S. S.; WAKIL, S. J. Human fatty acid synthase: proprieties and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, v. 92, n. 19, p. 8695-8699, 1995.

JENSTER, G. Coactivations and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Mol Cell Endocrinol*, v. 143, n. 1-2, p. 1-7, 1998.

JOHNSON, N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ*, v. 65, n. 4, p. 328-339, 2001.

KAWAMOTO, T. TAKAHASHI, K.; NISHI, M.; KIMURA, T.; MATSUMURA, T.; TANIGUCHI, S. Quantitative assay of epidermal growth factor receptor in human squamous cell carcinoma of the oral region by an avidin-biotin method. *Jpn J Cancer Res*, v. 82, n. 4, p. 403-410, 1991.

KHADEMI, B.; SHIRAZI, F. M.; VASEI, M.; DOROUDCHI, M.; GANDOMI, B.; MODJTAHEDI, H.; PEZESHKI, A. M.; GHADERI, A. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett*, v. 184, n. 2, p. 223-230, 2002.

KHAN, A. J.; KING, B. L.; SMITH, B. D.; SMITH, G.L; DiGIOVANNA, M. P.; CARTER, D.; HAFFTY, B. G. Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, v. 8, n. 2, p. 540-548, 2002.

KILL, I. R. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*, v. 109, p. 1253-1263, 1996.

KIYOTA, A.; SHINTANI, S.; MIHARA, M.; NAKAHARA, Y.; UHEYAMA, Y.; MATSUMURA, T.; TODD, R.; WONG, D. T. W. Expression of a truncated epidermal growth factor receptor in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Letters*, v. 161, n. 1, p. 9-15, 2000.

KOKONTIS, J. M.; LIAO, S. Molecular action of androgen in the normal and neoplastic prostate. *Vitam Horm*, v. 55, p. 219-307, 1999.

KOLIBABA, K. S.; DRUKER, B. J. Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1333, n. 3, p. F217-F248, 1997.

KONGER, R. L.; CHAN, T. C.; Epidermal growth factor induces terminal differentiation in human epidermoid carcinoma cells. *J Cell Physiol.*, v. 156, n. 3, p. 515-521, 1993.

KRONTIRAS, H.; ROYE, G. D.; BEENKEN, S.E.; MYERS, R. B.; MAYO, M. S.; PETERS, G. E.; GRIZZLE, W. E. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck*, v. 21, n. 4, p. 325-329, 1999.

KUHAJDA, F. P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*, v. 16, n. 3, p. 202-208, 2000.

KUHAJDA, F. P.; PIZER, E. S.; LI, J. N.; MANI, N. S.; FREHYWOT, G. L.; TOWNSEND, C. A. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *PNAS*, v. 97, n. 7, p. 3450-3454, 2000.

KUMAR, M. V.; SHIMOKAWA, T.; NAGY, T. R.; LANE, M. D. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *PNAS*, v. 99, n. 4, p. 1921-1925, 2001.

KUMAR-SINHA, C.; IGNATOSKI, K. W.; LIPPMAN, M. E.; EITHER, S. P., CHINNAIYAN, A. M. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Research*, v. 63, n. 1, p. 132-139, 2003.

KUROPKAT, C.; VENKATESAN, T. K.; CALDARELLI, D. D.; PANJE, W. R.; HUTCHINSON, J.; PREISLER, H. D.; COON, J. S.; WERNER, J. A. Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Auris Nasus Larynx*, v. 29, n. 2, p. 165-174, 2002.

KUSAKABE, T.; NASHIMOTO, A.; HONMA, K.; SUZUKI, T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology*, v. 40, n. 1, p. 71-79, 2002.

KUSUKAWA, J.; HARADA, H.; SHIMA, I.; SASAGURI, Y.; KAMEYAMA, T.; MORIMATSU, M. The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, v. 32B, n. 4, p. 217-221, 1996.

KUTTAN, N. A.; BHAKTHAN, N. M. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinomas: overexpression, localization and therapeutic implications. *Indian J Dent Res*, v. 8, n. 1, p. 9-18, 1997.

LACASA, D.; LE LIEPVRE, X.; FERRE, P.; DUGAIL, I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem*, v. 276, n. 15, p. 11512-11516, 2001.

LEE, D. K.; CHANG, C. Endocrine Mechanisms of disease. Expression and degradation of androgen receptor: mechanisms and clinical implication. *J Clinical Endocrinology of Metabolism*, v. 88, n. 9, p. 4043-4054, 2003.

LEONARD, J.; KEARSLEY, J.; CHENEVIX-TRENCH, G.; HAYWARD, N. Analysis of gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, v. 48, n. 4, p. 511-515, 1991.

LI, J. N.; GOROSPE, M.; CHERST, F. J.; KUMARAVEL, T. S.; EVANS, M. K.; HAN, W. H.; PIZER, E. S. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and citotoxic effects modulated by p53. *Cancer Research*, v. 61, n. 4, p. 1493-1499, 2001.

LIN, D. I.; WALTREGNY, D.; GRANER, E.; SIGNORETTI, S.; GARRAWAY, L. A.; LODA, M. Androgen-dependent regulation of Her-2/neu (c-ErbB2) in prostate cancer cells. *J Cell Biochem*, in press.

LOFTUS, T. M.; JAWORSKY, D. E.; FREHYWOT, G. L.; TOWNSEND, C. A.; RONNETT, G. V.; LANE, M. D.; KUHAJDA, F. P. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, v. 288, n. 5475, p. 2379-2381, 2000.

LONGVA, K. E.; BLYSTAD, F. D.; STANG, E.; LARSEN, A. M.; JOHANNESSEN, L. E.; MADSHUS, I. H. Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol*, v. 156, n. 5, p. 843-854, 2002.

MAGNIFICO, A.; TAGLIABUE, E.; ARDINI, E.; CASALINI, P.; COLNAGHI, M. I.; MENARD, S. Heregulin $\beta 1$ induces the down regulation and the ubiquitin proteosome degradation pathway of p185HER2 oncoprotein. *FEBS Letters*, v. 422, n. 2, p. 129-131, 1998.

MAIORANO, E.; FAVIA, G.; MAISONNEUVE, P.; VIALE, G. Prognostic implications of epidermal growth factor receptor immunoreactivity in squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *J Pathol*, v. 185, n. 2, p. 167-174, 1998.

MANSOUR, O. I.; SNYDERMAN, C. H.; D'AMICO, F. Association between tobacco use and metastatic neck disease. *Laryngoscope*, v. 113, n. 1, p. 161-166, 2003.

MARGOTTA, V.; CAPOGRECO, M. Soft tissue pathologies of the oral cavity. *Minerva Stomatol*, v. 52, n. 1-2, p. 47-51. 2003.

McKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev*, v. 20, n. 3, p. 321-344, 1999.

MEDES G.; THOMAS, A; WEINHOUSE, S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissues slices in vitro. *Cancer Research*, v. 13, n. 1, 1953.

MILGRAUM, L. Z.; WITTERS, L. A.; PASTERNAK, G. R.; KUHAJDA, F. P. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res.*, v. 3, n. 11, p. 2115-2120, 1997.

MILLER, C. S.; HENRY, R. G; RAYENS, M . K. Disparities in risk of and survival from oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 95, n. 5, p. 570-575, 2003.

MIMNAUGH, E. G.; CHAVANY, C.; NECKERS, L. Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J Biol Chem.*, v. 271, n. 37, p. 22796-22801, 1996.

MIYACHI, K.; FRITZLER, M. J.; TAN, E. M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol.*, v. 121, n. 6, p. 2228-2234, 1978.

MYERS, R.B.; OELSCHLAGER, D. K.; WEISS, H. L.; FROST, A. R.; GRIZZLE, W. E. Fatty acid synthase: an early molecular marker of progression of prostatic adenocarcinoma to androgen independence. *The Journal of Urology*, v. 165, n. 3, p. 1027-1032, 2001.

NAGLER, R. M.; KERNER, H.; LAUFER, D.; BEN-ELIEZER, S.; MINKOV, I.; BEN-ITZHAK, O. Squamous cell carcinoma of the tongue: the prevalence and prognostic roles of p53, Bcl-2, c-erb-B2 and apoptotic rate as related to clinical and pathological characteristics in a retrospective study. *Cancer Lett.*, v. 186, n. 2, p. 137-150, 2002.

NAGPAL, J. K.; DAS, B. R. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future direction for its effective management. *Oral oncol.*, v. 39, n. 3, p. 213-221, 2003.

NEHSE, G.; TUNN, S. Androgen and progesterone receptors in oral carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*, v. 22, n. 2, p. 114-119, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. 3 ed. New York: Worth Publishers, 2000, cap. 21, p. 770-816.

NEMOTO, T.; TERASHIMA, S.; KOGURE, M.; HOSHINO, Y.; KUSAKABE, T.; SUZUL, T.; GOTOH, M. Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal

squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology*, v. 69, n. 6, p. 297-303, 2001.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

NOURI, A. M.; THOMPSON, C.; CANNELL, H.; SYMES, M.; PURKISS, S.; AMIRGHOFRAN, Z. Profile of epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in human malignancies: effects of exposure to EGF and its biological influence on established human tumor cell clones. *Int J Mol Med*, v. 6, n. 4, p. 495-500, 2000.

O-CHAROENRAT, P.; RHYS-EVANS, P.; COURT, W. J.; BOX, G. M.; ECCLES, S. A. Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. *Clin Exp Metastasis*, v. 17, n. 7, p. 631-639, 1999.

O-CHAROENRAT, P.; RHYS-EVANS, P. H.; ECCLES, S. A. Expression and regulation of c-erbB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*, v. 88, n. 5, p. 759-765, 2000.

O-CHAROENRAT, P.; RHYS-EVANS, P. H.; ECCLES, S. A. Characterization of ten newly-derived human head and neck squamous carcinoma cell lines with special reference to c-erbB proto-oncogene expression. *Anticancer Res*, v. 21, n. 3B, 1953-1963, 2001.

O-CHAROENRAT, P.; RHYS-EVANS, P. H.; MODJTAHEDI, H.; ECCLES, S. A. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, v. 38, n. 7, p. 627-640, 2002a.

O-CHAROENRAT, P.; RHYS-EVANS, P. H.; ARCHER, D. J.; ECCLES, S. A. C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. *Oral Oncology*, v. 38, n. 1, p. 73-80, 2002b.

OKAMOTO, I.; KENYON, L. C.; EMLET, D. R.; MORI, T.; SASAKI, J.; HIROSAKO, S.; ICHIKAWA, Y.; KISHI, H.; GODWIN, A. K.; YSHIOKA, M.; SUGA, M.; MATSUMOTO, M.; WONG, A. J. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.*, v. 94, n. 1, p. 50-56, 2003.

O'MALLEY B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol*, v. 4, n. 3, p. 363-369, 1990.

ONIZAWA, K.; NISHIHARA, K.; YAMAGATA, K.; YUSA, H.; YANAGAWA, T.; YOSHIDA, H. Factors associated with diagnostic delay of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, v. 39, n. 8, p. 781-788, 2003.

OOKHTENS M.; KANNA, R.; LYON I.; BAKER, N. Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *Am J Physiol*, v. 247, n. 1, p. 146-153, 1984.

OSKOUIAN, S. Overexpression of fatty acid synthase in SKBR3-breast cell line is mediated via a transcriptional mechanism. *Cancer Lett*, v. 149, n. 1-2, p. 43-51, 2000.

PARTRIDGE, M.; GULLICK, W. J.; LANGDON, J. D.; SHERRIFF, M.; Expression of epidermal growth factor receptor on oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 26, n. 5, p. 381-389, 1988.

PENUEL, E.; SCHAEFER, G.; AKITA, R. W.; SLIWKOWSKI, M. X. Structural requirements for ErbB2 transactivation. *Semin Oncol*, v. 28, n.6, p. 36-42. 2001.

PIYATHILAKE, C. J.; FROST, A. R.; MANNE, U; BELL, W. C.; WEISS, H.; HEIMBURGER, D. C.; GRIZZLE, W. E. The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol*, v. 31, n. 9, p. 1068-1073, 2000.

PIZER, E. S.; JACKISCH, C.; WOOD, F. D.; PASTERNAK, G. R.; DAVIDSON, N. E.; KUHAJDA, F. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res*, v. 56, n. 12, p. 2745-2747, 1996a.

PIZER, E. S.; WOOD, F. D.; HEINE, H. S.; ROMANTSEV, F. E.; PASTERNAK, G. R.; KUHAJDA, F. P. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res*, v. 56, n. 6, p. 1189-1193, 1996b.

PIZER, E. S.; LAX, S. F.; KUHAJDA, F. P.; PASTERNAK, G. R.; KURMAN, R. J. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer*, v. 83, n. 3, p. 528-537, 1998a.

PIZER, E. S.; CHREST, F. J.; DIGIUSEPPE, J. A.; HAN, W. F. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Research*, v. 58, p. 4611-4615, 1998b.

PIZER, E. S. THUPARI, J.; HAN, W. F.; PINN, M. L.; CHREST, F. J.; FREHYWOT, G. L.; TOWNSEND, C. A.; KUHAJDA, F. Malonyl-coenzyme A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Research*, v. 60, n. 2, p. 213-218, 2000.

PIZER, E. S.; PFLUG, B. R.; BOVA, G. S.; HAN, W. F.; UDAN, M. S.; NELSON, J. B. Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate*, v. 47, n. 2, p. 102-110, 2001.

QUIGLEY, C. A.; DE BELLIS, A.; MARSCHKE, K. B.; EL-AWADY, M. K.; WILSON, E. M.; FRENCH, F. S. Androgen receptor detects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev*, v. 16, n. 3, p. 271-321, 1995.

RAMASWANY, S.; ROSS, K. N.; LANDER, E. S.; GOLUB, T. R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*, v. 33, n. 1, p. 49-54, 2003.

RASHID, A.; PIZER, E. S.; MOGA, M.; MILAGRUM, L. Z.; ZAHURAK, M.; PASTERNAK, G. R.; KUHAJDA, F. P.; HAMILTON, S. R. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol*, v. 150, n. 1, p. 201-208, 1997.

ROSS, J. S.; LINETTE, G. P.; STEC, J.; CLARK, E.; AYERS, M.; LESCHLY, N.; SYMMANS, W. F.; HORTOBAGY, G. N.; PUSZTAI, L. breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 3, n. 5, p. 573-585, 2003.

ROSSI, S.; GRANER, E.; FEBBO, P.; WEINSTEIN, L.; BHATTACHARYA, N.; ONODY, T.; BUBLEY, G.; BALK, S.; LODA, M. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Molecular Cancer Research*, v. 1, n. 10, p. 707-715, 2003.

SABINE, J. R.; ABRAHAM, S. Control of lipid metabolism in hepatomas: insensitivity of rate of fatty acid and cholesterol synthesis by mouse hepatoma BW7756 to fasting and to feedback control. *Cancer Res*, v. 27, n. 4, p. 793-799, 1967.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, v. 17, n. 5, p. 914-921, 1994.

SARANATH, D.; PANCHAL R. G.; NAIR, R.; MEHTA, A. R; SANGHAVI, V. D.; DEO, M. G. Amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor gene in human oropharyngeal cancer. *Eur. J. Cancer. B Oral Oncol*, v. 28B, n. 2, p. 139-143, 1992.

SATO, T.; IMAI, N.; AKIMOTO, N.; SAKIGUCHI, T.; KITAMURA, K.; ITO, A. Epidermal growth factor and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppress lipogenesis in hamster sebaceous gland cells in vitro. *J Invest Dermatol.*, v. 117, n. 4, p. 965-970, 2001.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SHINTANI, S.; FUNAYAMA, T.; YOSHIHAMA, Y.; ALCALDE, R. E.; MATSUMURA, T. Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*, v. 95, n. 1-2, p. 79-83, 1995.

SHIRASUNA, K.; HAYASHIDO, Y.; SUGIYAMA, M.; YOSHIOKA, H.; MATSUYA, T. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.*, v. 418, n. 4, p. 349-353, 1991.

SHURBAJI, M. S.; KALBFLEISCH, J. H.; THURMOND, T. S. Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. *Hum Pathol*, v. 27, n. 9, p. 917-921, 1996.

SIGNORETTI, S.; MONTIRONI, R.; MANOLA, J.; ALTIMARI, A.; TAM, C.; BUBLEY, G.; BALK, S. THOMAS, G.; KAPLAN, I.; HLATKY, L.; HAHNFELDT, P.; KANTOFF, P.; LODA, M. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, v. 92, n. 23, p. 1918-1925, 2000.

SILVA, S. D.; AGOSTINI, M.; NISHIMOTO, I. N.; COLETTA, R. D.; ALVES, F. A.; LOPES, M. A.; KOWALSKI, L. P.; GRANER, E. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncology*, in press.

SITTEL, C.; RUIZ, S.; VOLLING, P.; KVASNICKA, H. M.; JUNGEHÜLSING M, ECKEL, H. E. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral oncology*, v. 35, n. 6, p. 583-589, 1999.

SLAMON, D. J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L. A.; HOLT, J. A.; WONG, S. G.; KEITH, D. E.; LEVIN, W. J.; STUART, S. G.; UDOVE, J.; ULRICH, A. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science*, v. 244, n. 4905, p. 707-712, 1989.

STOOPS, J. K.; WAKIL, S. J. Animal fatty acid synthase. A novel arrangement of the β -ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 256, n. 10, p. 5128-5133, 1981.

STORKEL, S.; REICHERT, T.; REIFFEN, K.; WAGNER, W. EGFR and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas - a valuable tool in estimating the patient's prognosis. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, v. 29B, n. 4, p. 273-277, 1993.

SWINNEN, J.V.; ESQUENET, M.; GOOSSENS, K.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res.*, v. 57, n. 6, p. 1086-1090, 1997a.

SWINNEN, J.V.; ULRIX, W.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G. Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *PNAS*, v. 94, p. 12975-12980, 1997b.

SWINNEN, J. V.; VANDERHOYDONC, F.; ELGAMAL, A. A.; EELEN, M.; VERCAEREN, I.; JONIAU, S.; VAN POPPEL, H.; BAERT, L.; GOOSSENS, K.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G. Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer*, v. 88, n. 2, p. 176-179, 2000a.

SWINNEN, J. V.; HEEMERS, H.; DEBOEL, L.; FOUFELLE, F.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein bpathway. *Oncogene*, v. 19, n. 45, p. 5173-5181, 2000b.

SWINNEN, J. V.; ROSKAMS, T.; JONIAU, S.; VAN POPPEL, H.; OYEN, R.; BAERT, L.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer*, v. 98, n. 1, p. 19-22, 2002.

SWINNEN, J. V.; VAN VELDHoven, P. P.; TIMMERMANS, L.; DE SCHRIJVER, E.; BRUSSELMANS, K.; VANDERHOYDONC, F.; VAN DE SANDE, T.; HEEMERS, H.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 302, n. 4, p. 898-903, 2003.

TAKAHIRO, T.; SHINICHI, K.; TOSHIMITSU, S. Expression of Fatty Acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*, v. 9, n. 6, p. 2204-2212, 2003.

THUPARI, J. N.; PINN, M. L.; KUHAJDA, F. P. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 285, n. 2, p. 217-223, 2001.

TOSCHI, L.; BRAVO, R. Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol.*, v. 107, n. 5, p. 1623-1628, 1988.

TSANG, D. K.; CROWE, D. L. The mitogen activated protein kinase pathway is required for proliferation but not invasion of human squamous cell carcinoma lines. *Int J Oncol*, v. 15, n. 3, p. 519-523, 1999.

TSURIMOTO, T. PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1443, n. 1-2, p. 23-39, 1998.

TUMULURI, V.; THOMAS, G. A.; FRASER, I. S. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, v. 31, n. 10, p. 598-604, 2002.

VAN DE SANDE, T.; DE SCHRIJVER, E.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, v. 62, n. 3, p. 642-646, 2002.

VISCA, P.; ALÒ, P. L.; DEL NONNO, F.; BOTTI, C.; TROMBETTA, G.; MARANDINO, F.; FILIPPI, S.; DI TONDO, U.; DONNORSO, R. P. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-relating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clinical Cancer Research*, v. 5, n. 12, p. 4111-4118, 1999.

VISCA, P.; SEBASTIANI, V.; PIZER, E. S.; BOTTI, C.; DE CARLI, P.; FILIPPI, S.; MONACO, S.; ALO', P. L. Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res*, v. 23, n. 1A, p. 335-339, 2003.

VLAD, L. D.; AXAOTIS, C. A.; MERINO, M. J. Fatty acid synthase is highly expressed in aggressive thyroid tumors. *Mod Pathol*, v. 12, p. 70, 1999.

WAKIL, S. J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*, v. 28, n.11, p. 4523-4530, 1989.

WANG, X.; BRIGGS, M. R.; HUA, X.; YOKOYAMA, C.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M.S. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of the low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterisation. *J. Biol. Chem.*, v. 268, n. 19, p. 14497-14504, 1993.

WANG, Y.; KUHAJDA, F. P.; LI, J. N.; PIZER, E. S.; HAN, W. F.; SOKO II, L. J.; CHAN, D. W. Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett*, v. 167, n. 1, p. 99-104, 2001.

WEISS L.; HOFFMANN, G. E.; SCHREIBER R.; ANDRES, H.; FUCHS, E.; KORBER, E.; KOLB, H. J. Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor

importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, v. 367, n. 9, p. 905-912, 1986.

WELSH, J. B.; SAPINOSO, L. M.; SU, A. I.; KERN, S. G.; WANG-RODRIGUEZ, J.; MOSKALUK, C. A.; FRIERSON, H. F.; HAMPTON, G. M. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*, v. 61, n. 16, p. 5974-5978, 2001.

WEN, Y.; HU, M. C.; MAKINO, K.; SPOHN, B.; BARTHOLOMEUSZ, G.; YAN, D. H.; HUNG, M. C. HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res.*, v. 60, n. 24, p. 6841-6845, 2000.

WERKMEISTER, R.; BRANDT, B.; JOOS, U. The erbB oncogenes as prognostic markers in oral squamous cell carcinomas. *Am J Surg*, v. 172, n. 6, p. 681, 683, 1996.

WERKMEISTER, R.; BRANDT, B.; JOOS, U. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncology*, v. 36, n. 1, p. 100-105, 2000.

WIKSTRAND, C. J.; HALE, L. P.; BATRA, S. K.; HILL, M. L.; HUMPHREY, P. A.; KURPAD, S. N.; MCLENDON, R. E.; MOSCATELLO, D.; PEGRAM, C. N.; REIST, C. J.; et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas *Cancer Res.*, v. 55, n. 14, p. 3140-3148, 1995.

WILKMAN, T. S.; HIETANEN, J. H.; MALMSTROM, M. J.; KONTTINEN, Y. T. Immunohistochemical analysis of the oncoprotein c-erb-B2 expression in oral benign and malignant lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 27, n. 3, p. 209-212, 1998.

WÜNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol*, v. 38, n. 8, p. 737-746, 2002.

XIA, W.; LAU, Y. K.; ZHANG, H. Z.; LIU, A. R.; LI, L.; KIYOKAWA, N.; CLAYMAN, G. L.; KATZ, R. L.; HUNG, M. C. Strong correlation between c-erb-B-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, v. 3, n. 1, p. 3-9, 1997.

XIA, W. et al. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res*, v. 5, n. 12, p. 4164-4174, 1999.

YAMADA, T.; TAKAGI, M.; SHIODA, S. Evaluation of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*, v. 73, n. 1, p. 67-70, 1992.

YANG, YU-AN; HAN, W. F.; MORIN, P. J.; CHREST, F. J.; PIZER, E. S. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Experimental Cell Research*, v. 279, n. 1, p. 80-90, 2002.

YARDEN, Y. Biology of Her2 and its importance in breast cancer. *Oncology*, v. 61 p.1-13, 2001.

YEH, S.; LIN, H. K.; KANG, H. Y.; THIN, T. H.; LIN, M. F.; CHANG, C. From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 96, n. 10, p. 5458-63, 1999

Anexo 1

Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells

Michelle Agostini^a, Sabrina D. Silva^a, Karina G. Zecchin^a, Ricardo D. Coletta^a, Jacks Jorge^a, Massimo Loda^b, Edgard Graner^{a,*}

^a Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry of Piracicaba, UNICAMP, Av. Limeira 901, CP 52, Piracicaba, SP, 13414-018, Brazil

^b Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA 02115, USA

**Corresponding author. Fax 55 19 3412-5218. E-mail address: egraner@fop.unicamp.br*

Abstract

Fatty acid synthase (FAS) is the enzyme responsible for the endogenous synthesis of saturated long-chain fatty acids from the precursors acetyl-CoA and malonyl-CoA. A growing body of evidence suggests that FAS is over expressed in several human cancers, such as prostate, breast, bladder, liver, lung, melanoma and oral squamous cell carcinoma (SCC). In the present study we used human oral SCC cell lines (SCC-4, -9, -15, and -25) as a model to investigate the role of FAS expression and activity in the pathogenesis of oral cancer. RT-PCR and western blot experiments demonstrated that FAS is differentially expressed by the four oral SCC cell lines, with the highest production in SCC-9 followed by SCC-25. FAS expression in SCC-4 and -15 was similarly lower than the other cell lines. Proliferation curves, immunocytochemistry for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67, and mitotic indexes demonstrated that SCC-25 has the highest proliferative potential. In addition, the specific inhibitor of FAS activity cerulenin was able to significantly reduce the proliferation of oral SCC cells. Expression of androgen receptor was low in SCC-4, -9, and -15 and undetectable in the SCC-25 cell line, whereas epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erb-B2 were expressed in high amounts by the four cell lines. Immunocytochemical reactions showed that SCC-25 expresses higher levels of epidermal growth factor (EGF) compared to the other three cell lines. Finally, oral SCC cells exposed to nanomolar concentrations of exogenous EGF presented a reduction in the FAS protein levels concomitant with a decrease in their proliferation rates. Taken together, our results indicate that FAS is expressed in an apparently androgen-independent fashion in oral SCC cells and it is necessary for their proliferation.

Keywords

oral squamous cell carcinoma; cell culture, fatty acid synthase; ErbB2; Her-2/neu; EGFR; RA, EGF, oral cancer

Introduction

Fatty acid synthase (FAS, EC2.3.1.85) is the anabolic multifunctional enzyme responsible for the endogenous synthesis of saturated long-chain fatty acids from the small carbon substrates acetyl-CoA and malonyl-CoA [1,2]. It is structurally arranged as a homodimer formed by two long polypeptide chains (~250 kDa) containing seven distinct catalytic sites [3]. In normal cells, except lipogenic tissues as liver, lactating breast, fetal lung, and adipose tissue, FAS activity is minimal since most of the fatty acids are supplied by the dietary fat [4,1]. However, FAS null mutant mice (Fasn $-/-$) die at the preimplantation stage and most of the heterozygotes (Fasn $+/-$) die *in utero* even in the presence of a diet rich in saturated fatty acids [5]. It has been recently demonstrated that FAS expression is up-regulated in a variety of human epithelial cancers, including prostate, breast, ovarian, bladder, lung, melanoma, stomach and oral squamous cell carcinoma (SCC) [6-16] as well as in soft tissue sarcomas [17]. Moreover, FAS expression seems to be a potential prognostic marker for several tumors [18, 19, 20, 21, 14].

It has been demonstrated that progesterone stimulate FAS expression in breast cancer cell lines [22], whereas androgens and epidermal growth factor (EGF) up-regulate FAS expression and activity in the androgen-dependent prostate cancer cell line LNCaP [23-26]. Despite this fact, FAS is also over expressed in androgen-independent prostate cancers [27-

28]. Several lines of evidence show that FAS specific inhibitors block DNA synthesis and cause apoptosis in prostate, breast and colon cancer cell lines [29-31] and are able to decrease the size of prostate cancer xenographs [27]. Moreover, an enhanced FAS expression and activity is necessary for the production of membrane phospholipids in LNCaP cells [32], suggesting that FAS support the membrane synthesis in cancer cells.

In this study, we sought to determine if the FAS expression is associated with the proliferation of human oral SCC cell lines. Herein we show that FAS is produced by human oral SCC cells in an apparently androgen-independent manner and is important for their proliferation, since its specific inhibition significantly reduces the cell growth.

Materials and Methods

Cell culture

The cell lines SCC-4, -9, -15, and -25 (ATCC, Manassas, VA) were maintained in DMEM/F12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 400 ng/ml hydrocortisone and 100 µg/ml gentamycin and kanamycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. In order to analyze the role of EGFR on FAS expression, cell cultures were exposed to 150 ng/ml of EGF (Sigma, St. Louis, MO) after a 16h incubation in DMEM/F12 containing 0.5% FBS [33]. The FAS specific inhibitor cerulenin (Sigma) was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and added to the culture medium at a final concentration of 5 µg/ml.

Proliferation curves

SCC cells were seeded in 24-well plates (5×10^3 /well) and after 24h the DMEM/F12 containing 10% FBS was changed by serum-free medium. Following an incubation of 48h in the absence of FBS, DMEM/F12 10% FBS was added back, cells from triplicate wells trypsinized after 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 and 192h and counted in an automated cell counter (Coulter Counter Z-1, Beckman). The experiments were made in triplicates.

Immunocytochemistry and mitotic index

Cells were plated in 8-well chamber slides (2×10^4 per well) (Lab Tek, Nunc, Naperville, IL) in DMEM/F12 containing 10% FBS and starved for 48h in serum-free DMEM/F12. Then, the DMEM/F12 10% FBS was added back to the cultures and after 24h the slides were fixed in 70% ethanol (for Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen - PCNA) or 3.7% paraformaldehyde (for epidermal growth factor receptor - EGFR, epidermal growth factor - EGF, FAS, and c-erb-B2). Primary antibodies anti-Ki-67 (MIB-1) (1:200), anti-PCNA (1:60,000), anti-EGFR (H11) (1:500), anti-c-erb-B2 (1:500) (Dako, Carpinteria, CA), anti-EGF (Ab-3) (1:30) (Oncogene, Boston, MA), and anti-FAS (1:200) (Transduction Laboratories, Lexington, KY) were incubated overnight at 4°C and washed in phosphate-buffered saline (PBS). After incubation with secondary antibodies and the streptavidin-biotin complex, the reactions were developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) and counter stained with Carazzi's hematoxylin. For the

mitotic indexes cells were plated as described above, fixed in 70% ethanol and stained with Carazzi's hematoxylin. Mitotic indexes and the percentage of positive cells for Ki67 or PCNA were calculated in duplicate wells with the aid of an image computer analyzer (Kontron 400, Carl Zeiss, Germany).

Protein extraction and western blots

Cells were scraped and lysed in a buffer containing 10% sucrose, 1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 1 µg/ml leupeptin and 1 µg/ml aprotinin. Protein lysates were placed on ice for 30 min, vortexed every 10 min, and cleared by centrifugation at 12,000 xg for 15 min at 4°C. The supernatants were retrieved and frozen at -80 °C until use. The protein concentration was determined using the Bradford method [34]. Forty micrograms of each protein lysate were resolved on 6% SDS-polyacrylamide gels, transferred onto nitrocellulose membranes (Protran, Schleicher & Schuell, Keene, NH) and stained with Ponceau S (Sigma) to verify the transfer efficiency and equal sample loading. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-HCl pH 7.6 containing 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20 (TBST) and probed for 2 h at room temperature with the following antibodies: anti-FAS (1:3,000) (Transduction Laboratories), anti-androgen receptor (AR - PG-21) (1.5 µg/ml) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), anti-EGFR (Ab-3) (1:1,000) (Dako), anti-c-erbB2 (1:20,000) (Dako) or anti-beta actin (AC-15) (1:40,000) (Sigma). After washing in TBST, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary

antibodies diluted at 1:1,000, washed again and developed with an enhanced chemiluminescence detection system (ECL detection kit, Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) according to manufacturer's instructions. Membranes were exposed to X-Omat AR films (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). The results were quantitated by densitometric analysis using a GS-700 Densitometer and the Molecular Analyst Software (Bio-Rad, Hercules, CA).

RNA purification and RT-PCR

Total RNA was extracted from cell pellets using the Trizol reagent (Invitrogen). Before the RT reactions, all RNA samples were treated with 1 U of DNase I (amplification grade, Invitrogen) for 10 min at room temperature in order to eliminate genomic DNA contamination. For cDNA synthesis, 5 µg of total RNA were reverse-transcribed in a 21 µl reaction containing 0.5 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 40 U of RNase inhibitor, 50 U of the Superscript II RT enzyme (Invitrogen), 0.5 µg oligo-dT primers and 1x buffer (containing 1.5 mM MgCl₂). The reaction mix was incubated at 42°C for 50 min and 70°C for 15 min. Reactions without the RT enzyme were used as negative controls. Specific primers for FAS (forward: AACTCCTTGGCGGAAGAGA; reverse: TAGGACCCCGTGGAATGTCA) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) (forward: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC; reverse: GAAGATGGTGATGGGATTTC) were designed using the Amplify 1.2 software (University of Wisconsin, Madison, WI) and sequences from the GeneBank. FAS transcripts

were amplified in 50 µl reactions containing 2 µl of cDNAs, 2 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 0.2 mM of each primer. The cycling conditions were 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 95°C for 45s, 55°C for 45s, 72°C for 45s, 72°C for 4 min. Two microliters of each RT-PCR product were resolved in 8% non-denaturing polyacrylamide gels, silver stained as described by [35] and analyzed by densitometry as described above.

Results

Oral SCC cell lines differentially express FAS

RT-PCR reactions showed the presence of FAS transcripts in all four studied cell lines, with a higher expression in SCC-9 and -25 (Fig. 1 A and B). Accordingly, the FAS protein levels were higher in SCC-9 and -25 than in SCC-4 and -15 (Fig. 1 C and D). To further substantiate these results, we confirmed by immunocytochemistry that SCC-9 and -25 clearly show the strongest cytoplasmic labeling for FAS (Fig. 1 E). FAS was homogeneously distributed in the cytoplasm of SCC-4, -9, and -15, whereas SCC-25 showed an evident perinuclear positivity in most of the cells (Fig. 1 E).

Oral SCC cell proliferation is dependent on FAS activity

The growth rates of the four cell lines were compared by the construction of proliferation curves using an automated cell counter and by immunocytochemical reactions for the nuclear antigens Ki-67 and PCNA. As shown in Fig. 2 A, SCC-25 has a

significantly higher proliferative potential than SCC-4, -9, and -15, which was confirmed by the immunodetection of Ki-67 and PCNA (Fig. 2 B and C) and mitotic indexes (data not shown). In order to directly verify whether the inhibition of FAS activity would interfere in the proliferation rates of oral SCC cell lines, we next cultured SCC-9 (which showed the highest amounts of both FAS mRNA and protein - Fig. 1) in the presence of 5 µg/ml of the natural FAS specific inhibitor cerulenin. As depicted in Fig. 2 D, cerulenin significantly inhibits SCC -9 cell proliferation as compared with the DMSO controls.

Production of AR, EGF, EGFR and c-erb-B2 by human oral SCC cells

The regulation of FAS expression in normal tissues or cancer cells is very complex and not completely understood. Taking in consideration previous reports demonstrating that AR [24], c-erb-B2 [36] and EGF [23] control FAS expression in different biological systems, we next compared their amounts in the oral SCC cells protein lysates using western blots. AR levels were low in SCC-4, -9, and -15 and not detectable in SCC-25 (Fig. 3 A) (the positive control for this reaction was a rat prostate e testis protein lysate, which provided a strong band - data not shown), whereas EGFR bands were stronger in SCC-4 and -15 than in SCC-9 and -25 (Fig. 3 B). A second smaller band was observed in the SCC-25 lysates and possibly corresponds to the 145 kDa EGFR deletion mutant EGFRvIII [37]. This mutant form of the receptor can be recognized by the antibodies used here and is constitutively activated. Its expression may explain the proliferative advantage of SCC-25 over the other three cell lines. c-erb-B2 was similarly produced by SCC-4, -9, and -15 and

showed a comparatively lower amount in SCC-25 (Fig. 3 C). The western blots for EGFR and c-erb-B2 were confirmed by immunocytochemistry (data not shown). EGF was detected by immunocytochemical reactions in the cytoplasm of all studied cell lines, with the highest expression in SCC-25 (data not shown).

EGF treatment reduces FAS expression levels

It has been shown that EGF has a biphasic effect on squamous cell carcinoma cell lines, since picomolar concentrations of this growth factor are mitogenic whereas nanomolar concentrations have no effect or even inhibit the cell growth [38, 39]. We then exposed SCC-9 (Fig. 4) to exogenous EGF and assayed FAS, EGFR and c-erb-B2 levels by western blots. As shown in Fig. 4 A, EFG promoted a clear reduction of FAS expression after incubations of 12 or 24 h. The EGFR protein levels were also drastically reduced after the same time periods (Fig. 4 B), due to its internalization, ubiquitination, and subsequent proteasomal degradation [40, 41]. A slight reduction in the c-erb-B2 level (Fig. 4 C) in the EGF-treated cells was also observed. This experiment was repeated using SCC-15 and the results were the same. The reduction of FAS protein as a result of the EFG treatment may account for the lack of proliferative response of oral SCC cells to high concentrations of this growth factor. Indeed, when incubated with EGF, these cell lines proliferate slower than the controls, as it occurs due to the cerulenin treatment (Fig. 4 E).

Discussion

Fatty acid metabolism has emerged as an important target for cancer therapy, since several human malignancies show over expression of FAS [7-15], the key metabolic enzyme for the *de novo* synthesis of fatty acids. FAS has been also pointed as a reliable prognostic marker for prostate, breast, and ovarian cancers and melanoma [11,18, 6, 19, 14]. Experimental data show that specific inhibitors of FAS activity are able to inhibit cell proliferation by blocking DNA replication during the S-phase and cause apoptosis [29-31]. Although very recently Swinnen et al. (2003) [32] showed that FAS activity is necessary for the production of membrane phospholipids in the androgen-dependent prostate cancer cell line LNCaP, the mechanism involved in the communication between the cell cycle progression and the lipid biosynthesis is still unknown.

In the present study, we have used established cell lines to investigate a possible role for FAS in the pathogenesis of oral SCC. Using RT-PCR, western blots and immunocytochemistry we show that FAS is differentially expressed in the four studied cell lines. Increased production of this enzyme in epithelial dysplasias and carcinoma of the oral tongue in comparison with the morphologically normal adjacent epithelium was reported by Krontiras et al. (1999) [7]. The fatty acid synthetic activity was recently shown to be inhibited by cerulenin in oral SCC tissue samples and in a lesser extent in normal oral mucosa samples [42]. In addition to these previous data, our results show for the first time that cerulenin, a specific inhibitor of FAS activity significantly inhibits oral SCC cell proliferation and add weight to the body of data indicating that lipid metabolism is essential for cancer cell proliferation [29-31]. Indeed, our experiments suggest a correlation between

cell proliferation and FAS mRNA and protein levels. Curiously, SCC-9 had the highest FAS expression levels and its growth rate was not significantly different from SCC-4 or -15, indicating that additional genetic alterations are necessary to up-regulate the cell growth.

The expression of FAS in the prostate cancer cell line LNCaP is controlled by androgens [24], however, it is also over expressed in androgen-independent prostate tumors as well [27,28]. Moreover, EGF is even more efficient than testosterone to stimulate FAS expression and activity in LNCaP cells [23], and progesterone regulates the mRNA levels of FAS in breast cancer cell lines [22]. Both hormonal- and EGF-induced FAS expression occurs via the steroid regulatory binding protein 1 (SREBP-1), which plays a key role in the control of lipogenic gene expression and lipid homeostasis [43]. The mechanisms underlying the co-ordination of fatty acid synthesis in oral SCC cells are not known at the moment. Our western blot results revealed that AR levels are low in SCC-4, -9, and -15 and not detectable in highly proliferative SCC-25. On the other hand, both EGFR and c-erb-B2 were highly expressed by these cell lines, suggesting a possible role for its ligands on the control of FAS expression. Both receptors have been implicated in the pathogenesis of oral SCC [44]. c-erb-B2 was recently shown to stimulate FAS promoter and enhance fatty acid synthesis in breast epithelial cells [36]. Importantly, the same report demonstrated that FAS inhibition promoted apoptosis preferentially in c-erb-B2 over expressing cells. Despite the fact that exogenous EGF evokes different responses depending on its concentration [38,39], our immunocytochemical reactions showed stronger reactions for EGF in SCC-25, suggesting an autocrine induction of cell growth.

In order to understand the role of EGF on FAS regulation, we exposed SCC-9 and -15 (cell lines presenting high and low FAS protein levels, respectively) to a high concentration of exogenous EGF and found that the amount of FAS protein was substantially reduced. This result explains, at least in part, the previously described growth inhibitory effect of the EGF treatment. Indeed, when exposed to the same EGF concentrations, our SCC cells exhibited a reduction in their proliferation rate, as it occurs in the cerulenin-treated cells. Interestingly, EGF exposure also inhibits both lipogenesis and proliferation of rat primary hepatocytes [45] and suppresses lipogenesis while stimulates proliferation of hamster sebaceous gland cells [46].

In summary, the results of the present study show that FAS is expressed by human oral SCC cell lines and plays an important role in their proliferation, probably in an androgen-independent fashion. In addition, if considered together with several experimental evidences recently published with different biological models, our results suggest that FAS is a potential chemotherapeutic target for oral SCC treatment.

Acknowledgements: MA and SDS were supported by Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Ensino Superior, CAPES, Brasil. This work was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, grant 02/08030-1 (to EG).

References

1. Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2000; 16 (3): 202-208.

2. Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*, in press.
3. Brink J, Ludtke SJ, Yang C, Gu Z, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *PNAS*, 2002, 99 (1): 138-143.
4. Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Korber E, Kolb HJ. Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986; 367(9): 905-912.
5. Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, Finegold M, Wakil S. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(11):6358-63.
6. Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res.* 1996, 56 (6): 1189-1193.
7. Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; 21(4): 325-329.
8. Oskouian B. Overexpression of fatty acid synthase in SKBR3 breast cancer cell line is mediated via a transcriptional mechanism. *Cancer Lett* 2000, 28 (1-2): 43-51.
9. Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC, Grizzle WE. The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the

- development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 2000; 31(9): 1068-1073.
10. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001; 412(6849): 822-826.
 11. Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Hampton GM. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61 (16): 5974-5978.
 12. Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology* 2002; 40(1): 71-79.
 13. Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L, Heyns W, Verhoeven G. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 2002; 98 (1): 19-22.
 14. Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G, Ricciardi G, Bosman C, Calvieri S. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol USA* 2003; 30(1): 23-28.
 15. Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T, Bubley G, Balk S, Loda M. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res* 2003; 1 (10): 707-715.

16. Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, Filippi S, Monaco S, Alo PL. Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23(1A): 335-339.
17. Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9(6): 2204-2212.
18. Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 1996; 77 (3): 474-482.
19. Gansler TS, Hardman W 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol* 1997; 28(6): 686-692.
20. Visca P, Alo PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F, Filippi S, Di Tondo U, Donnorso RP. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent non neoplastic mucosa. *Clin Cancer Res* 1999, 5 (12): 4111-4118.
21. Alo PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, Serpieri DE, Di Tondo U. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep* 2000; 7 (6): 1383-1388.
22. Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression: potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem* 2001; 276(15): 11512-11516.

23. Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Foufelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene* 2000; 19(45): 5173-5181.
24. Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res* 1997; 57 (6): 1086-1090.
25. Heemers H, Maes B, Foufelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endocrinol* 2001, 15 (10): 1817-1828.
26. Van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002, 62 (3): 642-646.
27. Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS, Nelson JB. Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate* 2001, 47 (2) 102-110.
28. Myers RB, Oelschlager DK, Weiss HL, Frost AR, Grizzle WE. Fatty acid synthase: an early molecular marker of progression of prostatic adenocarcinoma to androgen independence. *J Urol* 2001, 165 (3) 1027-1032.

29. Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis in androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res* 1997; 17(6D): 4589-4593.
30. Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58(20): 4611-4615.
31. Li J.N, Gorospe M, Chrest FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WF, Pizer ES. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res* 2001; 61 (4): 1493-1499.
32. Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, Van de Sande T, Heemers H, Heyns W, Verhoeven G. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302 (4): 898-903.
33. Ettenberg AS, Magnifico A, Cuello M, Nau MM, Rubstein XR, Yarden Y, Weissman AM, Lipokowitz S. cbl-b- dependent coordinated degradation of the epidermal growth factor receptor signaling complex. *J Biol Chem* 2001, 276 (29): 27677-27684.
34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72 (7): 248-254.
35. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapide silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994, 17 (5): 914-921.

36. Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res* 2003; 63 (1): 132-139.
37. Okamoto I, Kenyon LC, Emlet DR, Mori T, Sasaki J, Hirosako S, Ichikawa Y, Kishi H, Godwin AK, Yshioka M, Suga M, Matsumoto M, Wong AJ. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2003, 94 (1): 50-56.
38. Konger RL, Chan TC. Epidermal growth factor terminal differentiation in human epidermoid carcinoma cells. *J Cell Physiol* 1993, 156 (3): 515-521.
39. O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, Eccles, AS. Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. *Clin Exp Metastasis* 1999, 17 (7): 631-639.
40. Nouri AM, Thompson C, Cannell H, Symes M, Purkiss S, Amirghofran Z. Profile of epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in human malignancies: effects of exposure to EGF and its biological influence on established human tumor cell clones. *Int J Mol Med*. 2000, 6 (4):495-500.
41. Longva KE, Blystad FD, Stang E, Larsen AM, Johannessen LE, Madshus IH. Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol* 2002, 156 (5): 843-854.
42. Guo CB, Cui NB, Yu GY, Liu DX, Meng SC, Song Q. Effects of cerulenin on the endogenous fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 2003, 61 (8): 909-912.

43. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997, 89 (3): 331-340.
44. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284 (1): 99-110.
45. Geldeblom WC, Abel S, Smuts CM, Swanevelder S, Snyman SD. Regulation of fatty acid biosynthesis as a possible mechanism for the mitoinhibitory effect of fumonisin B1 in primary rat hepatocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999, 61 (4): 225-234.
46. Akimoto N, Sato T, Sakiguchi T, Kitamura K, Kohno Y, Ito A. Cell proliferation and lipid formation in hamster sebaceous gland cells. *Dermatology* 2002, 204 (2): 118-123.

Fig. 1. Expression of FAS in oral SCC cells -**A**-Semi-quantitative RT-PCR analysis of FAS expression in SCC -4, -9, -15 and -25. Five micrograms of total RNA was isolated, reverse transcribed and amplified using specific primers for FAS or GADPH. **B**-FAS expression levels normalized by GADPH. **C**- Western blotting analysis for FAS using proteins extracted from SCC -4, -9, -15 and -25. **D**-Densitometric analysis of FAS bands. **E**-Immunocytochemical detection of FAS in SCC -4, -9, -15 and -25 (x 400).

Fig. 2. FAS is required for oral SCC cell proliferation. **A**-SCC cells were plated at 5×10^3 /well in 24-well plates and after 24h the medium changed by serum-free DMEM/F-12. After 48h medium containing 10% FBS was added back, and 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h and 196h cells were trypsinized and counted in an automated cell counter. Data represent the values of 9 wells; SCC-4 (♦), SCC-9 (■), SCC-15 (▲) and SCC-25 (x) (Kruskall-Wallis: * $p < 0.001$; ** $p = 0.029$). **B and C**- Percentage of cells with nuclear positivity for Ki 67(**B**) ($\chi^2 = 958.64$; $p < 0,001$) and PCNA (**C**) ($\chi^2 = 183.07$; $p < 0,001$). **D**- The cell line SCC 9 (with the highest expression of FAS) was grown in the presence of 5µg/ml of the FAS specific inhibitor cerulenin and showed a significant inhibition of its proliferation when compared with the DMSO controls; 10% FBS + DMSO (♦), cerulenin (■) (Mann-Whitney: * $p < 0.001$; ** $p = 0.017$; *** $p = 0.002$).

Fig. 3. Western blotting analysis of total cellular proteins from SCC-4, -9, -15 and -25 utilizing anti-AR, anti-EGFR and anti-c-erb-B2 antibodies. Anti-β-actin antibodies were used as the loading control. **A**-AR levels were low in SCC -4, -9 and -15, and not detected in SCC -25. **B**-EGFR production was higher in SCC -4 and -15 than in SCC -9 and -25. **C**- The production of c-erb-B2 was similar in SCC -4, -9 and 15 and slightly lower in SCC -25. **D**- Anti-β-actin.

Fig. 4. Effect of EGF on FAS, EGFR and c-erb-B2 production by SCC-9 cells. Cells were incubated medium containing 0,5% FBS in the presence or absence of 150 ng/ml of EGF and after 12 or 24 h cells were lysed. Western blotting analysis demonstrated that EGF promoted a clear reduction of FAS (**A**) and EGFR (**B**) protein levels, whereas c-erb-B2 (**C**) was only slightly reduced. **D**- Anti-β-actin. **E**- In order to analyze the effect of EGF on SCC 9 cell proliferation, cultures were exposed to 150 ng/ml of EGF, trypsinized and cells counted in an automated cell counter. The EGF-treated cells had the growth inhibited, mainly after 48h of incubation. The natural FAS inhibitor cerulenin enhanced the inhibitory effect of EGF; 0.5% FBS (♦) EGF + DMSO (■), EGF +cerulenin (▲) (Mann Whitney: * $p = 0.002$; ** $p = 0.022$).

Figure 1

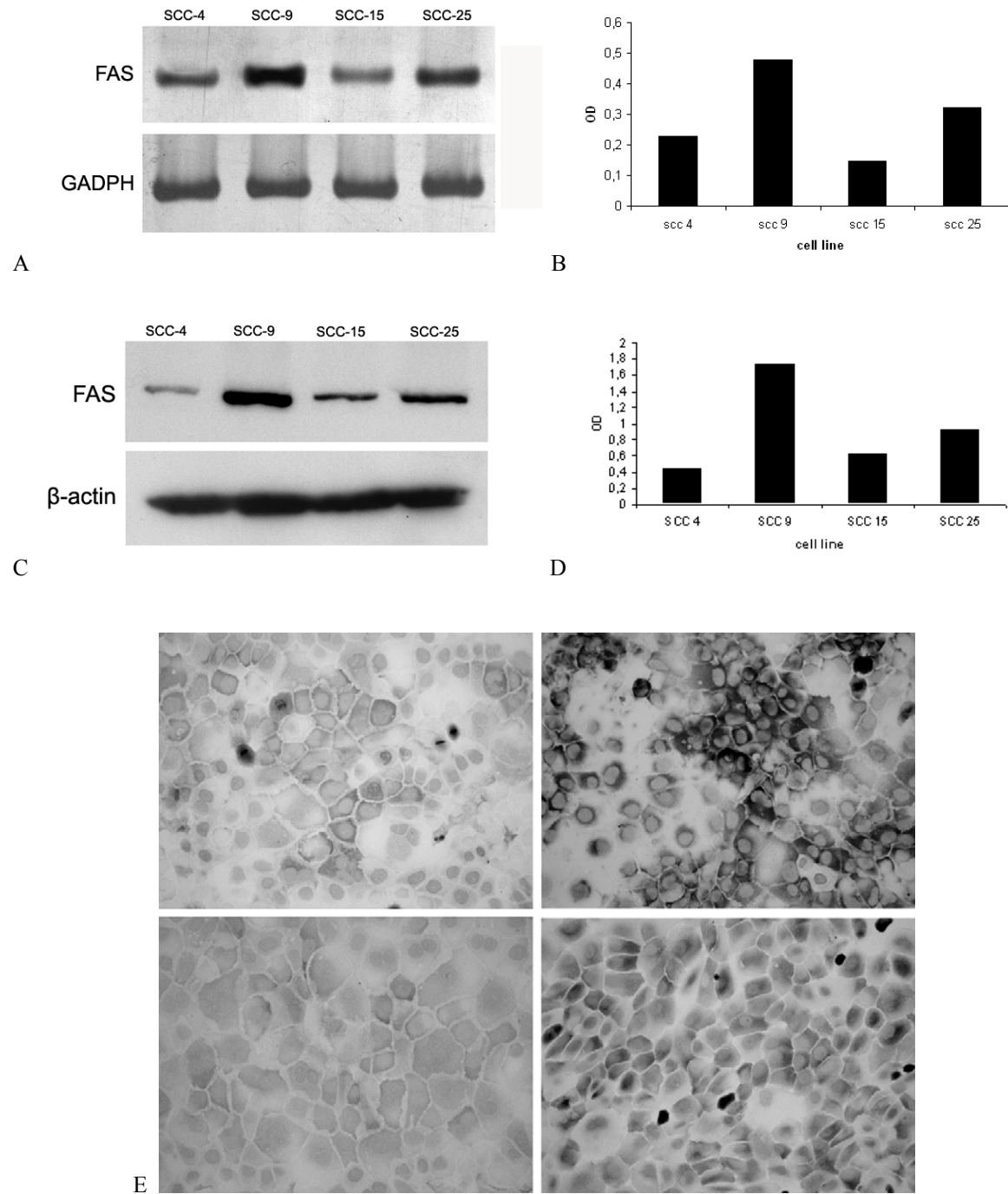


Figure 2

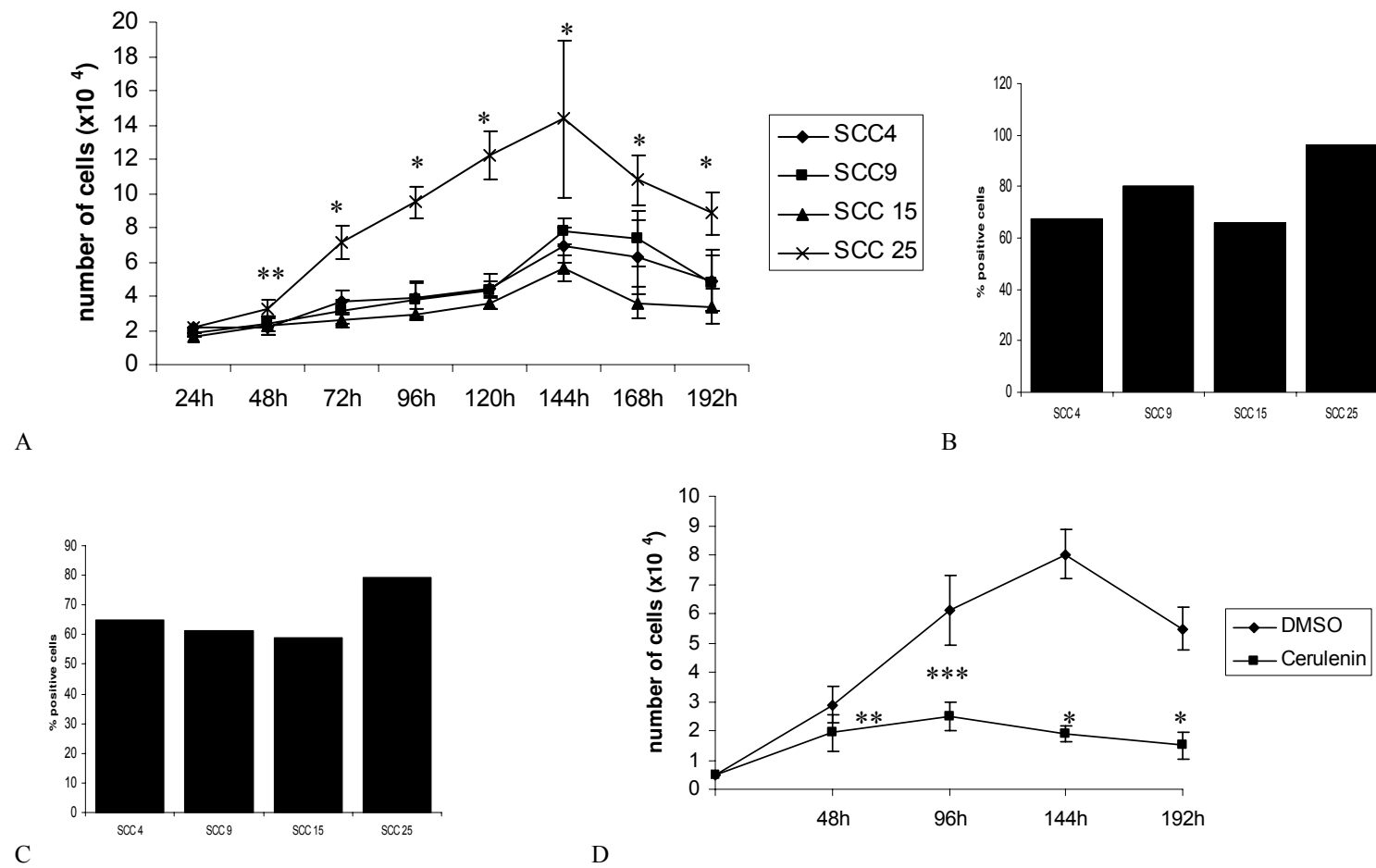


Figure 3

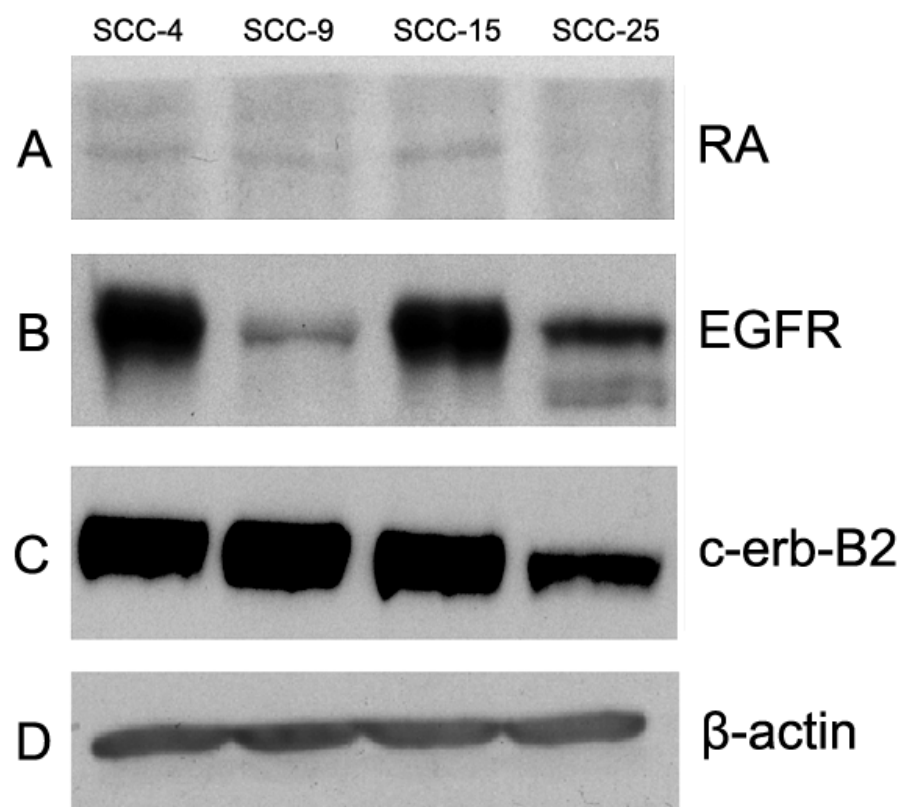
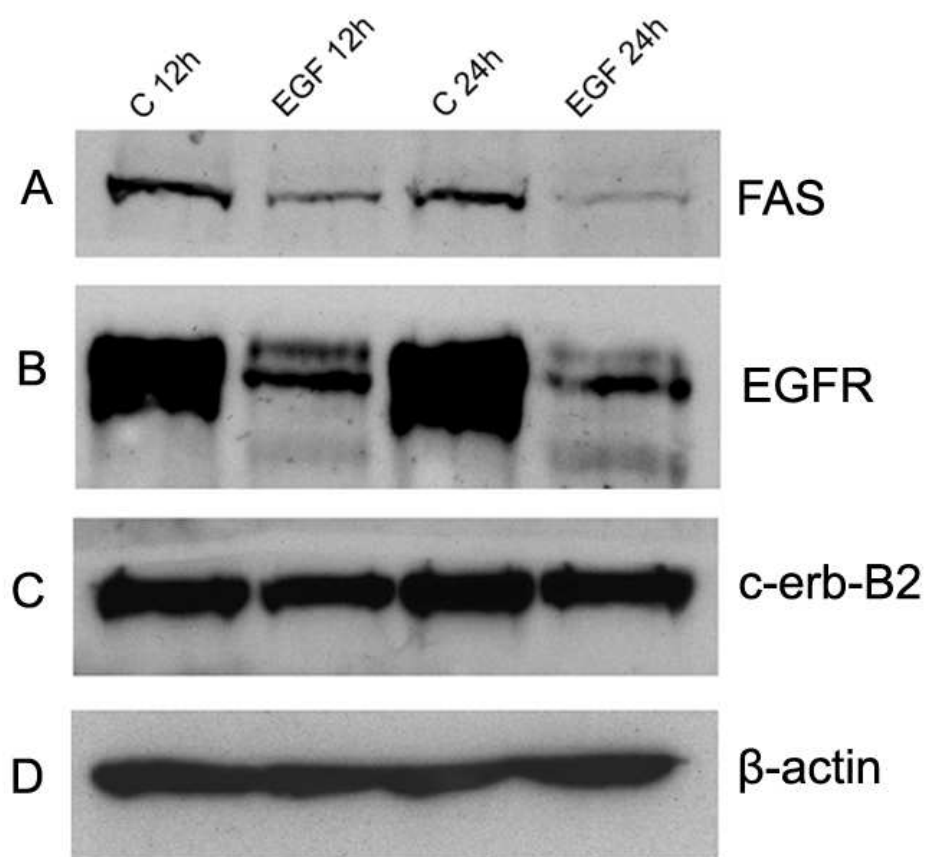


Figure 4



E

