



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



**“EFEITO DO ORLISTAT SOBRE A PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE  
DE CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR  
BUCAL HUMANO”.**

Autor(a): Cindy Goes Dodo

Piracicaba 2010

Cindy Goes Dodo

“EFEITO DO ORLISTAT SOBRE A PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE DE CÉLULAS  
DERIVADAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL HUMANO”.

Monografia apresentada ao Curso de  
Odontologia da Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção  
do diploma de Cirurgião Dentista

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Piracicaba

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA  
PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

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

D667e

Dodo, Cindy Goes.

Efeito do orlistat sobre a proliferação e apoptose de células derivadas de carcinoma espinocelular bucal humano / Cindy Goes Dodo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

41f. : il.

Orientador: Edgard Graner.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Patologia. I. Graner, Edgard. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família,  
que nunca mediram esforços para que eu  
conquistasse mais esta vitória

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar ao Prof. Dr. Edgard Graner, que me deu a oportunidade de realizar este projeto, desde meu segundo ano.

À Michelle Agostini pela paciência e dedicação em me ensinar e me ajudar durante a realização deste trabalho.

A todo o corpo de pós-graduação em Patologia Oral e Biologia Molecular pelo apoio e ajuda durante o período em que estagiei e realizei este trabalho.

A Fapesp, pela bolsa e oportunidade de apresentar este projeto em congressos.

As minhas “ames”, Thatiana Leite, Pamela Saptorski, Sthefanie Furlan, Camila Sobral, Carolina Barrichello, Aline Gomes que eu tanto amo e que além de serem minhas colegas de turma são minhas grandes amigas e minha família piracicabana.

Aos meus amigos Waldemir Vieira, Clovis de Moura, Gabriel Lino e Lucas Leão por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos dos anos de graduação.

Ao meu grande amigo Cauê Silveira Campi, por sempre estar disposto a me escutar e ajudar mesmo estando a quilômetros de distância.

## EPÍGRAFE

*O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

A enzima ácido graxo sintase (FASN) desempenha papel chave na lipogênese de células neoplásicas e apresenta alta expressão em vários tumores malignos humanos. Um grande número de evidências sugere que FASN seja um oncogene metabólico com papel importante no crescimento e sobrevivência de células tumorais. Diferentes inibidores da atividade de FASN têm sido utilizados, como a droga Orlistat, a qual demonstrou efeito anti-tumoral em algumas neoplasias, incluindo a redução em até 50% no número de metástases experimentais em melanomas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as conseqüências do tratamento com Orlistat sobre proliferação e apoptose das linhagens celulares derivadas de CECs bucais humanos SCC-9 e SCC-25. As células foram tratadas com concentrações de 50, 100 e 200  $\mu$ M de Orlistat na presença de 10% de soro fetal bovino pelos períodos de 12, 24, 48 e 72 horas, sendo então marcadas com anexina V para avaliação das taxas de apoptose ou com iodeto de propídio para análise do ciclo celular.

O efeito do Orlistat sobre o ciclo celular foi dose dependente, ocorrendo uma inibição de aproximadamente 70% da fase S para as duas linhagens após 72 horas de tratamento na concentração de 200  $\mu$ M. Entretanto, não observamos aumento significativo dos níveis de apoptose, como ocorre em células derivadas de outros tipos de tumores. Concluimos que o uso do inibidor da atividade de FASN Orlistat em células de CECs bucais humanos causa inibição significativa da progressão do ciclo celular, o que faz desta enzima um alvo terapêutico em potencial para estes tumores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carcinoma Espino-Celular - FASN – Orlistat

## **ABSTRACT**

The enzyme fatty acid synthase (FASN) plays a key role in lipogenesis in tumor cells and shows high expression in several human malignancies. A growing body of evidence suggests that FASN is a metabolic oncogene plays a major role in the growth and survival of tumor cells. Different activity of FASN inhibitors have been used as the drug Orlistat, which demonstrated anti-tumor effect in some cancers, including reducing by 50% in the number of metastases in experimental melanomas. The aim of this study was to evaluate the consequences of treatment with Orlistat on proliferation and apoptosis of cell lines derived from human oral SCC SCC-9 and SCC-25. Cells were treated with concentrations of 50, 100 and 200  $\mu$ M of Orlistat in the presence of 10% fetal bovine serum for periods of 12, 24, 48, 72 hours, and then stained with annexin V to assess the rates of apoptosis or propidium iodide for cell cycle analysis.

The effect of Orlistat on the cell cycle was dose-dependent inhibition occurring at approximately 70% of S phase for both strains after 72 hours of treatment at a concentration of 200  $\mu$ M. However, we observed no significant increase in levels of apoptosis, as occurs in cells derived from other tumor types. We conclude that use of the FASN inhibitor Orlistat activity in cells of human oral SCCs cause significant inhibition of cell cycle progression, which makes this enzyme a potential therapeutic target for these tumors.

**KEYWORDS:** Squamous cell carcinoma – FASN – Orlistat

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEC	Carcinoma espinocelular oral
SCC	Squamous carcinoma cell
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's Nutrient Mixture F12
PBS	"Phospate Buffered Saline" - Salina tamponada com fosfato
FBS	"Fetal bovine serum" – soro fetal bovino
<sup>14</sup> C	Carbono quatorze
RNAi	RNA interferase

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	2
---------------------	---

2. Revisão da literatura .....	3
2.1 Ácido graxo sintase (FASN).....	3
2.2 Carcinoma espinocelular (CEC) bucal.....	4
2.3 CECs bucais e FASN .....	5
2.4 Orlistat .....	6
2.5 Efeitos da inibição da atividade de FASN.....	7
3. Proposição .....	9
4. Materiais e métodos .....	9
4.1 Cultura de células.....	9
4.2 Preparo das soluções de Orlistat .....	10
4.3 Análises das fases do ciclo celular .....	10
4.4 Avaliações das taxas de apoptose .....	11
5. Resultados .....	11
5.1 Padronização do crescimento .....	12
5.2 Análise do efeito do Orlistat sobre ciclo celular das células SCC.....	13
5.3 Avaliações das taxas de apoptose .....	17
6. Discussão.....	19
7. Conclusão .....	22
* Referências.....	23

## 1. Introdução

A enzima FASN (ácido graxo sintase) é altamente expressa em várias neoplasias malignas humanas, tendo sido relacionada com um pior prognóstico para alguns tipos de tumores. FASN é a principal enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa e sua atividade é necessária para a síntese dos fosfolipídios da membrana das células malignas. Já foi previamente demonstrado que FASN é essencial para a proliferação de células derivadas de carcinomas espinocelulares (CECs) bucais humanos, sendo expressa em maiores quantidades nestes tumores do que no epitélio normal adjacente. A presença de metástases em linfonodos regionais é o fator prognóstico mais importante na progressão dos CECs bucais, as quais são encontradas em cerca de metade dos pacientes no momento do diagnóstico e contribuem significativamente para a diminuição da sobrevida. Em trabalho recente realizado em nosso laboratório (Carvalho *et al.*, 2008), foi demonstrado que a inibição de FASN por Orlistat, uma droga anti-obesidade, causou redução de 50% nas metástases espontâneas para linfonodos em melanomas experimentais. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito desta droga sobre a proliferação e taxas de apoptose nas linhagens celulares SCC-9 e -25, derivadas de CECs bucais humanos.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1 Ácido graxo sintase (FASN)

FASN é a principal enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda *et al.*, 2000a; Pizer *et al.*, 2000; Baron *et al.*, 2004; Stoops & Wakil, 1981). Em células normais, com exceção de tecidos altamente lipogênicos como fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões de recém nascidos, a atividade da FASN é mínima, pois a maior parte dos ácidos graxos utilizados são provenientes da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Kuhajda *et al.*, 2000b; Chirala *et al.*, 2001). Por outro lado, nas células malignas, a maior parte dos ácidos graxos é produto do aumento da atividade de FASN, sendo que sua expressão encontra-se elevada em diversos tipos de neoplasias malignas humanas como as de mama (Milgraum *et al.*, 1997), ovário (Alò *et al.*, 2000), próstata (Swinnen *et al.*, 2000), endométrio (Pizer *et al.*, 1998), tireóide (Vlad *et al.*, 1999), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000), colon (Visca *et al.*, 1999), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur, *et al.*, 2005), bexiga (Visca *et al.*, 2003) e carcinoma espinocelular bucal (Krontiras *et al.*, 1999, Agostini *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008a; Silva *et al.*, 2008b), bem como em sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2006). Em alguns destes tumores, a alta expressão desta enzima está associada a um pior prognóstico para o paciente (Alo *et al.*, 1996; Gansler *et al.*, 1997; Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Kuhajda, 2000a).

A alta atividade de FASN provavelmente gera vantagens que suportam o rápido crescimento celular nas neoplasias malignas (Baron *et al.*, 2004). A superexpressão de FASN também parece acompanhar o desenvolvimento de metástases, pois em um modelo murino transgênico de adenocarcinoma de próstata (TRAMP), uma alta expressão e atividade desta enzima foram evidentes na próstata dos camundongos com 12 semanas, ocorrendo aumento com a idade, progressão tumoral e em lesões metastáticas (Pflug *et al.*, 2003). Um estudo recente sugere um papel oncogênico para FASN, através da demonstração de que a expressão forçada de FASN em células epiteliais prostáticas imortalizadas (PEC) provoca o crescimento destas em “softagar” e aumenta significativamente a proliferação, e as torna tumorigênicas. (Migita *et al.*, 2009).

## **2.2 Carcinoma espinocelular (CEC) bucal**

Instituto Nacional de Câncer (INCA 2009) calculou 14.160 casos de neoplasias malignas de boca por ano (10.380 casos entre homens e 3.780 casos entre mulheres), com cerca de 3.500 óbitos, sendo o tumor de maior prevalência o CECs. Segundo estatísticas do INCA, a incidência de câncer de boca no Brasil ocupa o quinto lugar no sexo masculino e o sétimo no feminino. No estado de São Paulo a previsão foi de 4.510 casos por ano, a maior dentre todos os estados do Brasil.

Entre as neoplasias da cavidade oral e orofaringe, mais de 90% correspondem os CECs. Este tumor apresenta maior prevalência no gênero masculino, com uma proporção de aproximadamente 3:1, em decorrência da maior associação com o tabagismo e alcoolismo entre os homens. Entretanto, as diferenças na proporção homem/mulher vem diminuindo, muito provavelmente devido à adoção desses

hábitos também pelas mulheres (Iamaroon *et al.*, 2004; Scully & Felix, 2006). Apesar da relativa facilidade de detecção precoce desta doença, infelizmente a maioria dos casos ainda é diagnosticada nos estádios mais avançados. De acordo com o Ministério da Saúde (2009), menos de 1% dos casos de CEC bucal são detectados precocemente, ainda como carcinoma *in situ*, quando é possível obter a cura sem maiores prejuízos estéticos e funcionais ao paciente. No Brasil, como a maioria dos casos é diagnosticada tardiamente, os pacientes portadores de câncer de boca geralmente sofrem com as conseqüências de um tratamento cirúrgico mutilador e efeitos colaterais da radioterapia e da quimioterapia. Após o tratamento, angustiam-se com o retorno ao convívio social, devido às deformações físicas causadas pela terapia. Além do mais, as referidas terapias não são seletivas, isto é, tanto a quimioterapia, quanto a radioterapia incidem sobre células tumorais e não-tumorais e as margens cirúrgicas geralmente amplas, provocando seqüelas temporárias ou permanentes, agudas ou crônicas. Portanto, a pesquisa de novos agentes quimioterápicos que possam inibir a progressão deste tipo de câncer faz-se muito importante.

### **2.3 CECs bucais e FASN**

A síntese endógena de ácidos graxos em amostras de CECs bucais, tecidos adjacentes ao tumor e mucosa normal foi avaliada por Guo *et al.* (2000). Estes autores mostraram, através da incorporação de  $^{14}\text{C}$  nos lipídeos totais sintetizados pelas amostras teciduais, que os CECs produziram significativamente mais ácidos graxos do que os outros tecidos estudados. Em um trabalho subsequente, os mesmos autores mostraram que esta síntese é inibida pelo inibidor natural da atividade de FASN, cerulenina (Guo *et al.*, 2003). Um achado importante deste

estudo foi o fato da cerulenina não apresentar atividade inibitória sobre a síntese de ácidos graxos nas amostras de tecido normal.

Já foi também demonstrado, através de reações imunoistoquímicas, que a produção de FASN é maior em CECs bucais do que no epitélio adjacente morfológicamente normal, e, em contraste com outras malignidades, a FASN é mais positiva e ocorre nos CECs bem diferenciados (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004). Estes achados podem ser compreendidos com base em experimentos mostrando que a expressão de FASN é estimulada durante a diferenciação dos queratinócitos orais (Silva *et al.*, 2008b), sendo então as áreas de queratinização dos CECs bem-diferenciados mais positivas para FASN do que as regiões pobremente diferenciadas.

O papel essencial de FASN na proliferação de células derivadas de CECs bucais humanos foi demonstrado em trabalho prévio realizado por nosso grupo, no qual observamos que a inibição farmacológica desta enzima com cerulenina reduziu significativamente a proliferação destas células (Agostini *et al.*, 2004).

## **2.4 Orlistat**

A droga Orlistat é um derivado semi-sintético da lipstatina que inibe irreversivelmente as lipases gástricas e pancreáticas no interior do trato gastrointestinal (Guerciolini *et al.*, 1997). Atua também como um inibidor específico do sítio tioesterase de FASN, o qual pode ser observado na figura 1 (Kridel *et al.*, 2004). Um trabalho realizado por Browne *et al.*, 2006 demonstrou que Orlistat inibe FASN nas células endoteliais de vasos sanguíneos, causando bloqueio da síntese de ácidos graxos e inibição da proliferação destas células.

No mesmo trabalho, Orlistat inibiu a neovascularização humana em ensaio *ex vivo*, apresentando potencial anti-angiogênico. Este efeito foi atribuído ao fato de que a droga inibe a expressão do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) na superfície das células endoteliais. O bloqueio de FASN com o Orlistat causa ainda estresse no retículo endoplasmático e conseqüente morte das células tumorais prostáticas, além de prevenir o crescimento de tumores experimentais (Kridel *et al.*, 2004, Little *et al.*, 2007).



**Figura 1** – Organização dos domínios de FASN e seus sete sítios catalíticos ativos:  $\beta$ -ceatoacil sintase (KS), acetil/malonil-CoA transferase (MAT),  $\beta$ -hidroxiacil desidratase (DH), enoil redutase (ER),  $\beta$ -cetoacil redutase (KR), proteína carregadora de acil (ACP) e tioesterase (TE) ( modificada a partir de Pemble *et al.*, 2007).

## 2.5 Efeitos da inibição da atividade de FASN

As grandes diferenças na expressão e atividade de FASN entre células normais e tumorais aliadas ao fato da atividade de FASN estar restrita à síntese de ácidos graxos tornam esta enzima um alvo terapêutico em potencial para o tratamento do câncer (Kuhajda, 2000b; Menendez & Lupu, 2007). Vários trabalhos já demonstraram que a inibição de FASN, tanto farmacológica como através de RNAi, causa apoptose em células neoplásicas (Kuhajda 2000b; De Schrijver *et al.*, 2003), entretanto, o mecanismo através do qual isto ocorre ainda não está esclarecido. Sabe-se que a inibição de FASN produz rápida e significativa inibição da replicação do DNA e, conseqüentemente, da progressão da fase S em diferentes tipos de células malignas, como as de mama, próstata, cólon e leucemia mielóide (Pizer *et*

*al.*, 1996; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; De Schrijver *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2004). O acúmulo de malonil-CoA, que ocorre após o bloqueio da atividade de FASN, já foi sugerido como provável responsável pelo efeito citotóxico (Pizer *et al.* 2000; Li *et al.* 2001; Thupari *et al.* 2001; De Schrijver *et al.* 2003). Segundo Pizer *et al.* (1998), não há efeito direto dos inibidores de FASN no DNA ou na maquinaria da replicação, mas sim sobre a regulação do ciclo celular, que pode envolver a função de p53 (Li *et al.* 2001). A inibição de FASN com a droga Orlistat, que atua como um inibidor específico do sítio tioesterase da enzima, mostrou propriedades anti-tumorais e anti-proliferativas em modelo xenográfico de câncer de próstata e em linhagens tumorais de câncer de próstata e mama (Kridel *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 2004). Menendez *et al.* (2004, 2005) demonstraram que o tratamento das linhagens celulares derivadas de carcinoma de estômago (NCI-N87) e de mama (SK-Br3) com Orlistat causa, além da inibição da síntese de ácidos graxos, um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, retardando a entrada na fase S. O trabalho de Carvalho *et al.* (2008), realizado por nosso grupo, demonstrou uma redução de cerca de 50% nas metástases espontâneas de melanomas experimentais pela inibição farmacológica de FASN com Orlistat, provavelmente devido ao bloqueio do ciclo celular e indução de apoptose.

O efeito anti-tumoral da inibição de FASN está ligado à expressão aumentada de p27kip1 (Knowles *et al.*, 2004; Menendez *et al.* 2004) e diminuição da fosforilação de Akt (Wang *et al.*, 2005), causando também supressão transcricional do gene ErbB2 (Menendez *et al.*, 2004). Entretanto, os mecanismos regulatórios que ligam a inibição de FASN os efeitos anti-tumorais ainda não foram elucidados.

O fato de que a inibição de FASN atenua o crescimento tumoral e a proliferação de forma significativa, sugere que a atividade desta enzima esteja ligada com a integração molecular de vias de sinalização relacionadas ao metabolismo, proliferação e sobrevivência de células malignas (Menendez & Lupu, 2007).

É importante ressaltar que a utilização da inibição farmacológica de FASN como forma de quimioterapia para o tratamento de neoplasias malignas deve ser cautelosa, pois pode causar anorexia (Clegg *et al.*, 2002) e apresentar alto potencial teratogênico (Chirala *et al.*, 2003). Além do mais, um estudo do nosso grupo mostrou que cerulenina é capaz de inibir o crescimento de fibroblastos humanos normais em culturas primárias (Almeida *et al.*, 2005), sugerindo que a produção endógena de ácidos graxos não é pré-requisito somente para a proliferação e sobrevivência de células malignas. No entanto, a recente determinação da estrutura cristalográfica do domínio tioesterase da FASN humana, o sítio de inibição da droga Orlistat, revelou a base molecular para a inibição específica de FASN, e deve proporcionar embasamento para o rápido desenvolvimento de novas drogas (Pemble *et al.*, 2007).

### **3. Proposição**

O presente trabalho visa avaliar o efeito do Orlistat sobre o grau proliferação e de apoptose nas linhagens celulares SCC-9 e SCC-25, derivadas de CECs bucais humanos.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Cultura de células

As linhagens celulares SCC-9 e SCC-25, provenientes de CECs bucais humanos e adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, E.U.A.) estão estocadas no laboratório de Patologia da FOP-UNICAMP. As células foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> (NUNC, E.U.A.) em meio de cultura DMEM/F-12 (Invitrogen, E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Brasil), 400 ng/ml de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona – Eurofarma, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen) na diluição de 1:100 a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Subcultivos foram realizados na confluência de aproximadamente 60-70%. Para isso foi removido o meio de cultura, as células lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e incubadas a 37° C com 0,5 ml ou 2 ml de tripsina a 2 %, para frascos de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Após 6-8 minutos de incubação, as células estavam separadas do assoalho do frasco e a inativação da tripsina foi feita pela adição de 5- 10 ml de meio de cultura DMEM-F12 com 10% de PBS. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml (Corning E.U.A.) estéreis e estes centrifugados a 3000 rpm por 3 min. Os “pellets” de células foram resuspendidos em 5 ml de meio de cultura DMEM-F12 com 10% de FBS, as células contadas e replaqueadas em novos frascos de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup>. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h.

Para o bloqueio da atividade de FASN, Orlistat foi adicionado ao meio de cultura em concentrações de 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M, sendo nos controles utilizado volume de etanol absoluto equivalente ao da maior concentração (200  $\mu$ M).

#### **4.2 Preparo das soluções de Orlistat**

Para os experimentos em cultura de células, o Orlistat foi extraído de cápsulas de Xenical (Roche, Suíça) de acordo com Knowles *et al.* (2004). Cada cápsula foi solubilizada em 1ml de etanol, os produtos insolúveis removidos por centrifugação (12,000 xg por 5 min) e o sobrenadante (250 mM de Orlistat) armazenado a -80° C.

#### **4.3 Análises das fases do ciclo celular**

A porcentagem de células SCC-9 e -25 tratadas ou não com diferentes concentrações de Orlistat em cada fase do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo. Após 24 h de plaqueamento, o meio de cultura DMEM/F-12 10% FSB foi substituído por novo meio sem adição de FSB e as células incubadas por mais 48 h, quando tiveram início os tratamentos com 50, 100 e 200  $\mu$ M de Orlistat. Após os períodos de 48 e 72 horas, as células foram coletadas, fixadas em etanol 70% gelado por 16 h a -20°C. Após este período foram então lavadas em PBS gelado e tratadas com 10  $\mu$ g/mL de RNase (Sigma) a 37°C durante 1 h. Em seguida foram coradas com 50  $\mu$ g/mL de iodeto de propídeo a 4°C por 2 horas e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) equipado com laser de argônio e software CellQuest (BD Biosciences) em canal FL2.

Foram analisados 10.000 eventos e as populações celulares identificadas por suas características de tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência no software ModFit (Verity Software House, E.U.A.).

#### **4.4 Avaliações das taxas de apoptose**

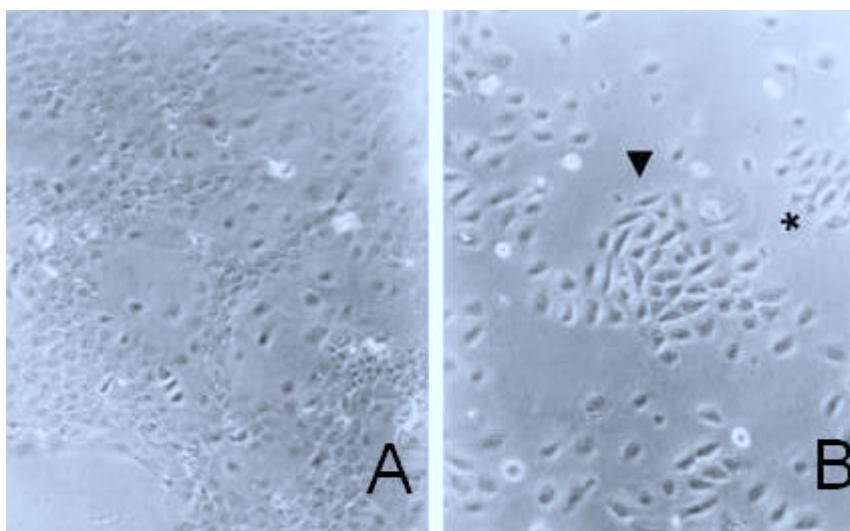
A porcentagem de células SCC-9 tratadas ou não com diferentes concentrações de Orlistat foi determinada por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences), em canal FL1, após a marcação com Anexina V (Invitrogen). Após os tratamentos com 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  de Orlistat por períodos de 12, 24, 48 e 72 horas, as células foram incubadas com Anexina V-FITC (1:500) em tampão de ligação contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 1,8 mM de  $\text{CaCl}_2$ , no escuro, por 20 minutos, a temperatura ambiente e fixadas em tampão de ligação contendo 0,1% paraformaldeído. Foram analisados 10.000 eventos.

### **5. Resultados**

#### **5.1 Padronização do crescimento**

A linhagem SCC-9 é composta por células arredondadas. Os núcleos são grandes com nucléolos bastante evidentes e poucas células são multinucleadas. Esta linhagem apresentou um padrão de crescimento em rede (Figura 2 A), sendo necessário um tempo de tripsinização de 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 2 B) 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 a SCC-9.



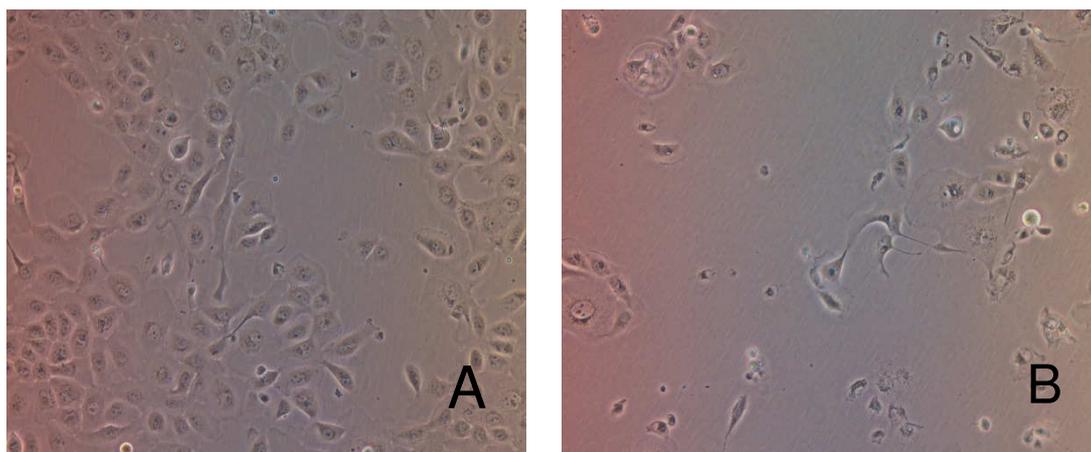
**Figura 2** – Aspecto morfológico das linhagens celulares SCC-9 (A) e -25 (B) em culturas subconfluentes, observadas em microscopia de contraste de fase (aumento original: 100x). Em A observa-se a formação de redes de células, característica da linhagem SCC-9 e em B células fusiformes presentes na linhagem -25 (▼), com seu típico crescimento em grumos.

Para que fossem analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) foi necessário estabelecer um número de células específico por frasco de 25 cm<sup>2</sup>. Nos experimentos para análise do ciclo celular, foram utilizadas na coleta de 48 h 72h 2,2x10<sup>6</sup> células e para 1,2x10<sup>6</sup> células.

Já nos experimentos para verificar as taxas de apoptose foram utilizadas na coleta de 24h  $3 \times 10^5$  células , na de 48h  $2 \times 10^5$  células e finalmente na de 72h  $1,2 \times 10^5$  .

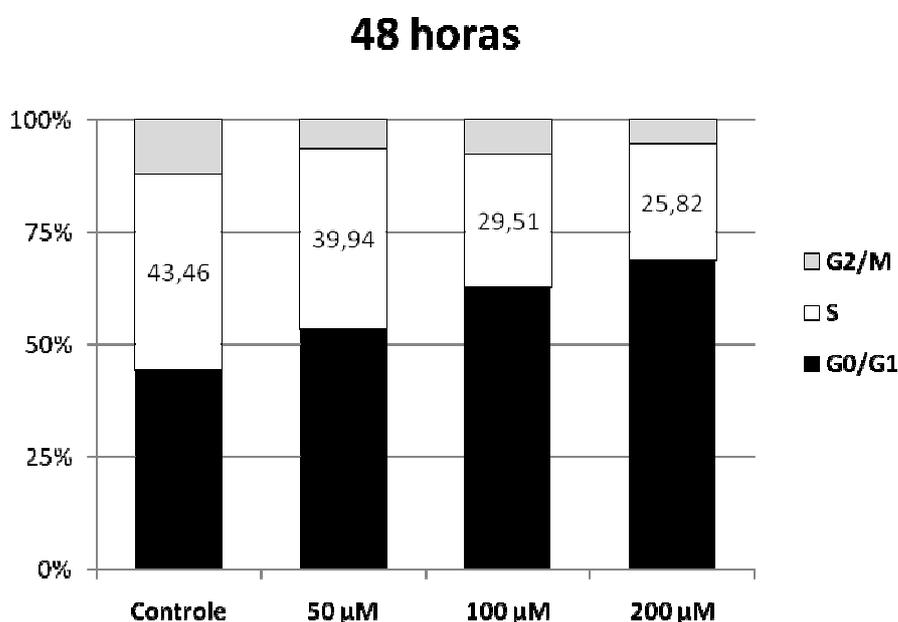
## 5.2 Análise do efeito do Orlistat sobre o ciclo celular das células SCC

O Orlistat foi utilizado nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  e etanol absoluto (veículo do Orlistat) foi considerado como controle em volume equivalente ao da maior concentração de Orlistat. As análises do ciclo celular foram realizadas após três repetições independentes dos experimentos com períodos de coleta de 48h e 72h. A Figura 3 A é uma imagem representativa do grupo controle de 72 horas e a Figura 3 B de células tratadas com Orlistat pelo mesmo período de tempo. O tratamento alterou a morfologia ao mesmo tempo em que reduziu o número de células aderidas no frasco de cultura.

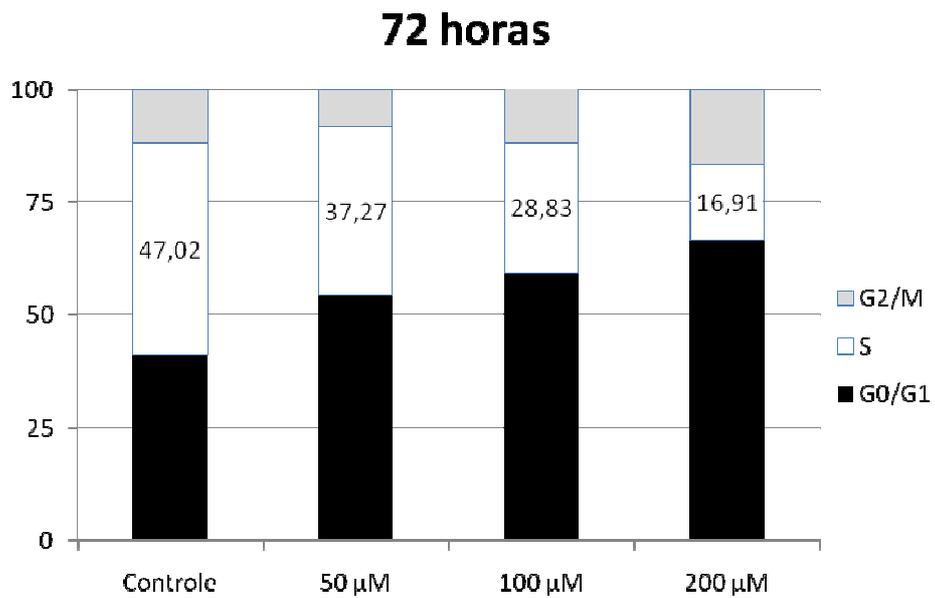


**Figura 3** - Aspecto morfológico das células SCC-9 do grupo controle, tratado com etanol absoluto por 72h (A) e tratadas com 100 $\mu$ M de Orlistat por 72h (B). Microscopia de contraste da fase S, aumento de 100x.

Como ilustrado nas Figuras 4 e 5, houve uma redução na porcentagem de células na fase S do ciclo celular, comparando-se os grupos tratados com os respectivos controles.

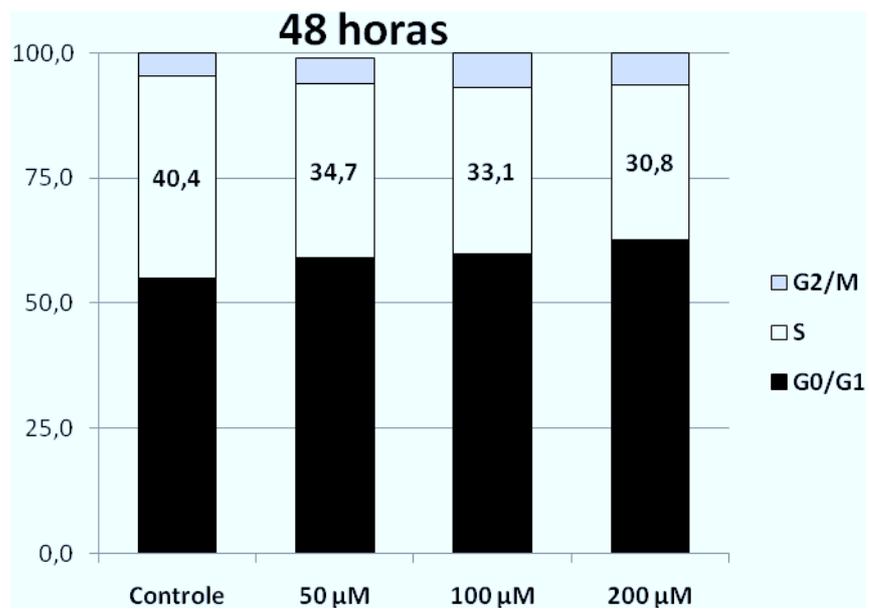


**Figura 4** – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células SCC-9 tratadas com 50, 100 e 200  $\mu$ M de Orlistat por 48 horas. A inibição da proliferação foi de 9% a 50  $\mu$ M, 32% a 100  $\mu$ M e 40% a 200  $\mu$ M.

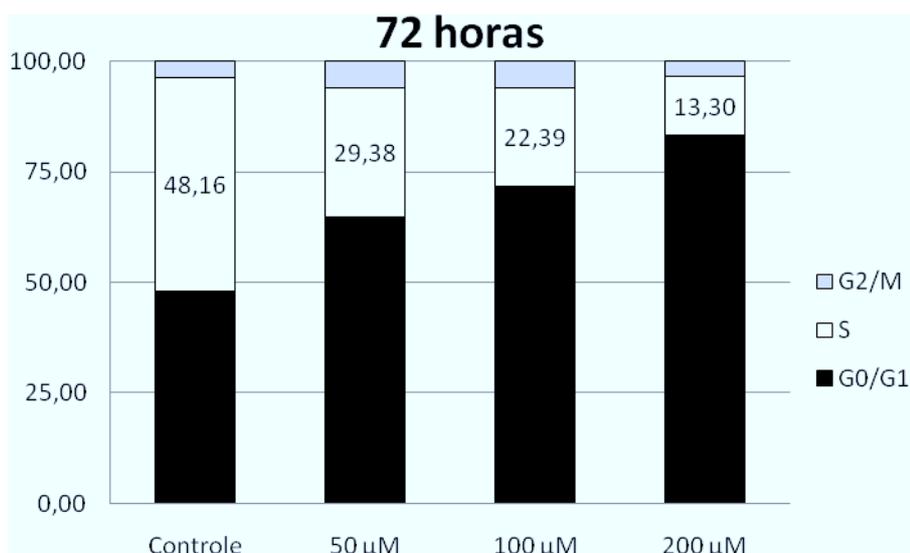


**Figura 5** – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células SCC-9 tratadas com 50, 100 e 200 µM de Orlistat por 72 horas. A inibição foi de 21% a 50 uM, 39% a 100 µM, 64% a 200 µM.

Como ilustrado nas Figuras 6 e 7 também houve uma redução na porcentagem de células SCC-25 na fase S do ciclo celular, comparando os grupos tratados com os respectivos grupos controles.



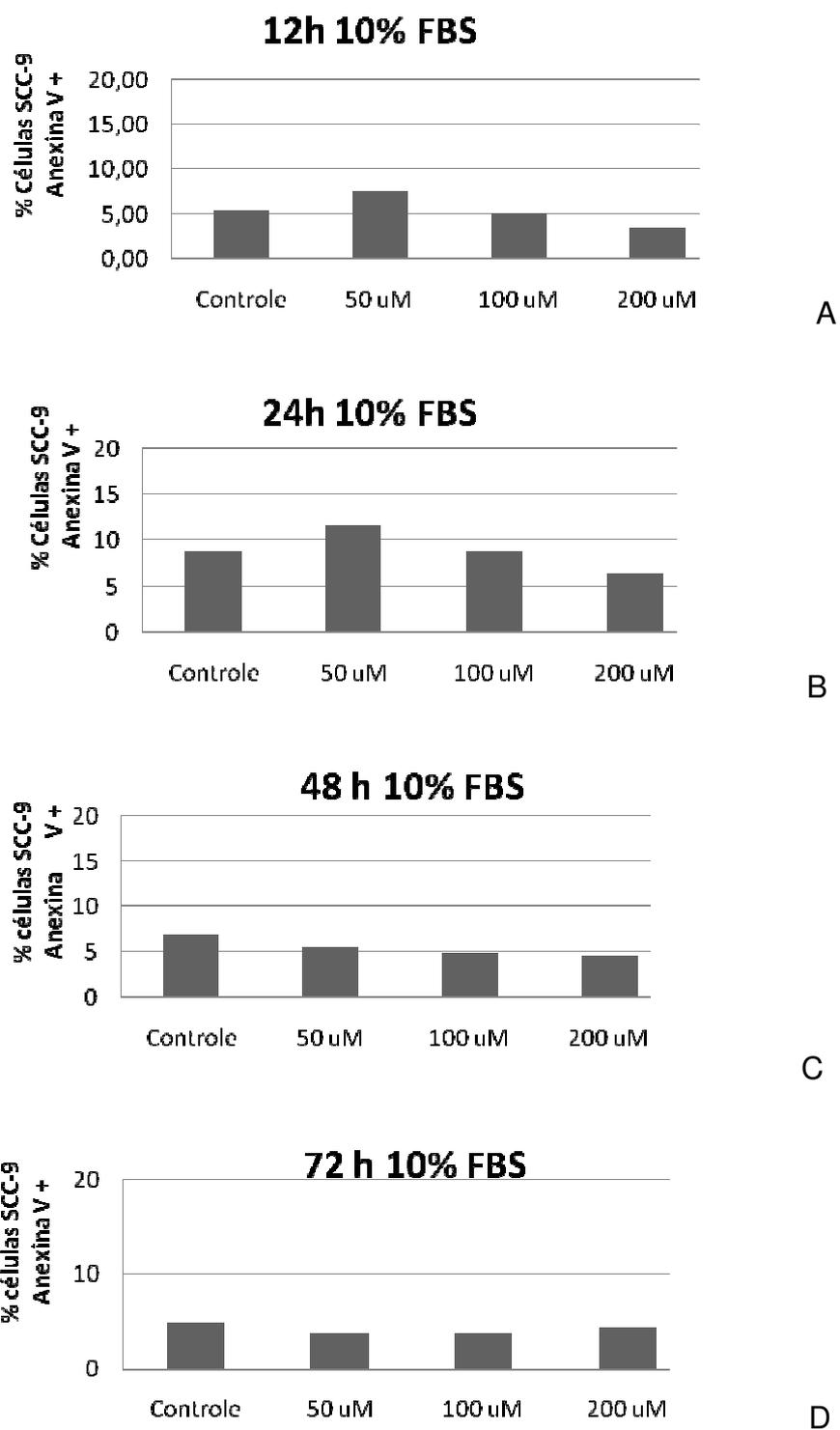
**Figura 6** - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células SCC-25 tratadas com 50, 100 e 200 µM de Orlistat por 48 horas. A inibição foi de 19% a 50 µM, 18% a 100 µM e 24% a 200 µM.



**Figura 7** - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células SCC-25 tratadas com 50, 100 e 200 µM de Orlistat por 72 horas. A inibição da proliferação 39% a 50 µM, 54 % a 100 µM, 73% a 200 µM.

### 5.3 Avaliações das taxas de apoptose.

Para avaliarmos as taxas de apoptose das células SCC-9 na presença de Orlistat na foram realizados experimentos com três repetições independentes, com 50 µM, 100 µM e 200 µM da droga e períodos de coleta de 12h, 24h, 48h e 72h. Não observamos diferenças estatisticamente significantes comparando as taxas de apoptose das células tratadas e controle (Figura 8). As taxas de apoptose das células SCC-25 estão sendo realizadas e ainda não obtivemos os resultados finais.



**Figura 8** – Análise da quantidade de células SCC-9 positivas para anexina V por citometria de fluxo, após tratamento com 50, 100 e 200  $\mu$ M de Orlistat por 12 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 (D). Note que nestas condições experimentais, Orlistat não modificou as taxas de apoptose SCC-9.

## 6. Discussão

Trabalhos recentes na literatura vêm demonstrando que a síntese lipídica endógena possui papel importante na proliferação de células malignas. A FASN, enzima responsável pela síntese de ácidos graxos, está presente em grandes quantidades em diversas neoplasias malignas humanas, 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, colon (Visca *et al.*, 1999), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001) (Visca *et al.*, 2003), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur, *et al.*, 2005), carcinomas espinocelulares bucais (CECs) (Krontiras *et al.* 1999; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.* 2004), sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2006). Em alguns destes tumores, a alta expressão desta enzima está associada a um pior prognóstico para o paciente (Alo *et al.*, 1996; Gansler *et al.*, 1997; Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Kuhajda, 2000). A alta atividade de FASN provavelmente gera vantagens que suportam o rápido crescimento celular nas neoplasias malignas (Baron *et al.*, 2004). A superexpressão de FASN também acompanha a seqüência de eventos no desenvolvimento de metástases. As diferenças na expressão e atividade de FASN entre células normais e tumorais aliados ao fato da atividade de FASN estar restrita à síntese de ácidos graxos tornam esta enzima um alvo terapêutico em potencial para o tratamento do câncer (Kuhajda, 2000; Menendez & Lupu, 2007).

A síntese endógena de ácidos graxos em amostras de CECs bucais, tecidos adjacentes ao tumor e mucosa normal foi avaliada por Guo *et al.* (2000).

Estes autores mostraram, através da incorporação de  $^{14}\text{C}$  nos lipídeos 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 pelo inibidor natural da atividade de FASN, cerulenina. O papel essencial de FASN na proliferação de células derivadas de CECs bucais humanos foi demonstrado em trabalho prévio realizado por nosso grupo, no qual observamos que a inibição farmacológica desta enzima com cerulenina reduziu significativamente a proliferação (Agostini *et al.*, 2004).

Um trabalho recente realizado por Browne *et al.* (2006) demonstrou que Orlistat inibe FASN nas células endoteliais, causando bloqueio da síntese de ácidos graxos e inibição da proliferação destas células. No mesmo trabalho, Orlistat inibiu a neovascularização humana em ensaio *ex vivo*, apresentando potencial antiangiogênico. Este efeito foi atribuído ao fato de que a droga inibe a expressão do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) na superfície das células endoteliais. O bloqueio de FASN com o Orlistat causa ainda estresse no retículo endoplasmático e conseqüente morte das células tumorais além de prevenir o crescimento de tumores experimentais (Kridel *et al.*, 2004, Little *et al.*, 2007).

Sabe-se que a inibição de FASN produz rápida e significativa inibição da replicação do DNA e, conseqüentemente, da progressão da fase S em diferentes tipos de células malignas, presentes no câncer de mama, próstata, cólon e leucemia mielóide (Pizer *et al.*, 1996; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; De Schrijver *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2004). O trabalho de Carvalho *et al.* (2008), realizado por

nosso grupo, demonstrou uma redução de 50% nas metástases espontâneas de melanomas experimentais pela inibição farmacológica de FASN com Orlistat, provavelmente devido ao bloqueio do ciclo celular e indução de apoptose.

Assim como estes trabalhos descritos acima nossos experimentos demonstram que o Orlistat provocou inibição da proliferação celular das células SCC-9 e SCC-25 na fase S. Temos então que na linhagem da SCC-9 o tratamento por 48 horas com o Orlistat provocou inibição 9%, 32%, 40%, com concentração de 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M de inibição. Nos tratamentos por 72 horas, observamos que o Orlistat a 50  $\mu$ M provocou 21% de inibição, a 100  $\mu$ M ocorreu 39% de inibição e finalmente a 200  $\mu$ M ocorreu 64% de inibição. Na linhagem da SCC-25 a análise do ciclo celular demonstrou que para o tratamento por 48 horas com 50  $\mu$ M causou 19% de inibição, a 100  $\mu$ M provocou 18 % de inibição e com 200  $\mu$ M houve 24% de inibição. Nos períodos mais curtos (24 horas) observamos com 50  $\mu$ M 39% uma taxa de inibição, com 100  $\mu$ M 54 % de inibição e com 200  $\mu$ M 73 % de inibição.

Vários trabalhos já demonstraram que a inibição de farmacológica FASN causa apoptose em células neoplásicas (Kuhajda 2000; De Schrijver *et al.*, 2003; Samudio *et al.*, 2010, Flavin *et al.*, 2010), entretanto, o mecanismo através do qual isto ocorre ainda não está esclarecido. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que em células de melanoma murino B16-F10, a morte por apoptose induzida pelo tratamento com Orlistat ou cerulenina ocorreu através da ativação da via intrínseca ou mitocondrial, com liberação de citocromo C e ativação das caspases 9 e 3( Zechin *et al.*, 2010). Nos experimentos deste trabalho não observamos efeitos significantes sobre as taxas de apoptose na linhagem SCC-9 durante os tratamentos por 12, 24, 48 e 72

horas com diversas concentrações de Orlistat. Em trabalho recente Dowling *et al.*, 2009 mostraram que o Orlistat causa apoptose em células de tumor gástrico, com concentrações de 100 e 500  $\mu$ M em período de 4 a 8 horas. Pretendemos, em experimentos futuros, reduzir os tempos de tratamento o que talvez revele alterações nos índices de apoptose nestas células. Caso contrário, os mecanismos biológicos de ação desta droga nas células SCC são provavelmente distintas das outras linhagens de células malignas.

## **7. Conclusão**

O efeito do Orlistat sobre o ciclo celular foi dose dependente, ocorrendo uma inibição de aproximadamente 70% da fase S para as duas linhagens após 72 horas de tratamento, na concentração de 200 $\mu$ M. Entretanto, não observamos aumento significativo dos níveis de apoptose na linhagem SCC-9, como ocorre em células derivadas de outros tipos de tumores. Portanto concluímos que o uso do inibidor da atividade de FASN Orlistat em células de CECs bucais humanos causa inibição significativa da progressão do ciclo celular, sem aparentemente ativar morte celular por apoptose.

## \*Referencias

- Agostini M, Silva S, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M *et al.* Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 2004; 40(7): 728-35.
- Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L *et al.* The proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol.* 2005; 76(2): 272-8.
- 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): 474-82.
- Alo'PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V *et al.* Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep.* 2000; 7(6): 1383-8.
- Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem.* 2004; 91(1): 47-53.
- Browed AC, Hindmarsh EJ, Smith JW. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J.* 2006; 20(12): 2027-35.

---

<sup>1</sup> De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel ALCA et al. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer*. 2008; 123(11): 2557-65.
- Chirala SS, Jayakumar A, Gu ZW, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(6): 3104-8.
- Clegg DJ, Wortman MD, Benoit SC, Mcosker CC, Seeley RJ. Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes*. 2002; 51(11): 3196-201.
- De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2003; 63(13): 3799-804.
- Dowling S, Cox J, Cenedella RJ. Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. *Lipids*. 2009; 44(6): 489-98.
- Epstein JI; Carmichael M; Partin AW 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.
- Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*. 2010; 6(4): 551-62.

- Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res.* 1997; 17(6D): 4589-93.
- Gansler TS, Hardman W3<sup>rd</sup>, Hunt DA, SCHAFFEL S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol.* 1997; 28(6): 686-92.
- Guerciolini R. Mode of action of Orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997; 21(Suppl 3): S12-S23.
- Guo CB, Guo CB, Cui LH, Yu GY, Liu DX, Meng SC *et al.* Endogenous fatty acid synthesis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 38(5): 506-8.
- 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 oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 16(8): 909-12.
- Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayasadok S, Jittidecharaks S *et al.* Analysis of squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(1): 84-8.
- Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G *et al.* Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol.* 2003; 30(1): 23-8.
- Kapur P, Rakheja D, Roy LC, Iloang MP. Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. *Modern Pathol.* 2005; 18: 1107-12.

- Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem.* 2004; 279(29): 30540-5.
- Kridel SJ, Axelrod F, Rosenkrants N, Smith W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res.* 2004; 64: 2070-5.
- Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE *et al.* Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck,* 1999; 21(4): 325-9.
- Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition.* 2000a; 16(3): 202-8.
- Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *PNAS.* 2000b; 97(7): 3450-4.
- Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology.* 2002; 40(1): 71-9.
- Li JN, Gorospe M, Cherst FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WH *et al.* Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and citotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res.* 2001; 61(4): 1493-9.
- Little JL, Wheeler FB, Fels DR, Koumenis C, Kridel SJ. Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res.* 2007 67(3):1262-9.

- Menendez JA, Vellon L, Mehimi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R *et al.* Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(29): 10715-20.
  
- Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral actions of the anti-obesity drug Orlistat (Xenical<sup>TM</sup>) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol.* 2005; 16(8): 1253-67.
  
- Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(10): 763-77.
  
- Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, *et al.* Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Apr 1;101(7):519-32. Epub 2009 Mar 24.
  
- Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997; 3(11): 2115-20.
  
- Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzul T *et al.* Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology.* 2001; 69(6): 297-303.
  
- Pemble CW 4th, Johnson LC, Kridel SJ, Lowther WT. Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. *Nat Struct Mol Biol.* 2007; 14(8): 704-9.

- Pflug BR, Pecher SM, Brink AW, Nelson JB, Foster BA. Increased fatty acid synthase expression and activity during progression of prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate*. 2003; 57(3): 245-54.
  
- Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC *et al.* The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol*. 2000; 31(9): 1068-73.
  
- Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda F. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1996; 56(12): 2745-7.
  
- Pizer ES, Lax SF, Kuhajda FP, Pasternack GR, Kurman RJ. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer* 1998; 83(3): 528-37.
  
- Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL *et al.* Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res*. 2000; 60(2): 213-8.
  
- Rossi, S.; Graner, E.; Febbo, P.; Weinstein, L.; *et al* Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Molecular Cancer Research* 2003; 1(10) : 707(15).

- Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Dei Tos AP, Fletcher JA, Loda M. Gastrointestinal stromal tumours overexpress fatty acid synthase. *J Pathol.* 2006 Jul;209(3):369-75.
- Samudio IJ, Duvvuri S, Clise-Dwyer K, Watt JC, Mak D, Kantarjian H, Yang D, Ruvolo V, Borthakur G. Activation of p53 signaling by MI-63 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 2010 May;51(5):911-9.
- Scully C, Felix DH. Oral medicine--update for the dental practitioner oral cancer. *Br Dent J.* 2006 14; 200(1): 13-7.
- Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA *et al.* Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol.* 2004; 40(7): 688-96.
- Silva SD, Cunha IW, Rangel AL, Jorge J, Zecchin KG, Agostini M *et al.* Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. *Virchows Arch.* 2008a; 453(1): 57-67.
- Silva SD, Perez DE, Nishimoto IN, Alves FA, Pinto CA, Kowalski LP *et al.* Fatty acid synthase expression in squamous cell carcinoma of the tongue: clinicopathological findings. *Oral Dis.* 2008b; 14(4): 376-82.
- Stoops JK, Wakil SJ. Animal fatty acid synthase. A novel arrangement of the  $\beta$ -ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *J Biol Chem.* 1981; 256(10): 5128-33.

- Swinnen JV, Vanderhoydonc F, Elgamal AA, Eelen M, Vercaeren I, Joniau S *et al.* Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer.* 2000; 88(2): 176-9.
- Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(6): 2204-12.
- Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285(2): 217-23.
- Visca P, Alo PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F *et al.* Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-relating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res.* 1999; 5(12): 4111-8.
- Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, Filippi S *et al.* Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res.* 2003; 23(1A): 335-9.
- Vlad LD, Axaotis CA, Merino MJ. Fatty acid synthase is highly expressed in aggressive thyroid tumors. *Mod Pathol.* 1999; 12: 70.
- Wang, Y.; Kuhajd, 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.* 2001; 167(1): 99-04.

- Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A *et al.* Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene*. 2005; 24(22): 3574-82.
  
- Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Korber E *et al.* Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1986; 367(9): 905-12.
  
- Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, Melo DR, Alberici LC, Oliveira HC, Castilho RF, Coletta RD, Vercesi AE, Graner E. Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. 2010 PMID: 20805790