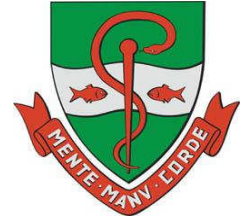




**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



**Efeito da inibição da atividade de ácido graxo sintase (FASN) com  
cerulenina sobre proliferação e morte de células derivadas de  
carcinomas espinocelulares bucais humanos.**

Ligia Rufo Spada

Piracicaba

2012

Ligia Rufo Spada

**Efeito da inibição da atividade de ácido graxo sintase (FASN) com cerulenina sobre proliferação e morte de células derivadas de carcinomas espinocelulares bucais humanos.**

Orientador: Edgard Graner

Piracicaba

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Spada, Ligia Rufo, 1990-

Sp11e

Efeito da inibição da atividade de ácido graxo sintase (FASN) com cerulenina sobre proliferação e morte de células derivadas de carcinomas espinocelulares bucais humanos / Ligia Rufo Spada. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Edgard Graner.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Apoptose. 2. Metástase. 3. Antitumoral. 4. Cancer. I. Graner, Edgard, 1968- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedico este trabalho especialmente aos meus pais, José Valdir Spada e Eliana Antunes Rufo Spada, que batalharam e deram tudo de si para que eu chegasse até aqui. Às minhas irmãs Débora e Marina que sempre me apoiaram e acreditaram em mim quando eu mesma duvidava. E ao meu namorado Gustavo Giovanini, que me guiou ao sucesso e a quem devo grande parte desta conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

Como não poderia deixar de ser, em primeiro lugar, agradeço àqueles que abdicaram ao conforto da própria vida para se dedicar à missão de fazer de suas filhas pessoas de sucesso: meus queridos pais. Obrigada por me acompanharem em cada passo e me ampararem quando acreditei não ser capaz. Obrigada por darem suas vidas pelo êxito de minha caminhada. Á vocês, serei eternamente grata.

Agradeço às minhas lindas irmãs, que desde os primórdios estiveram ao meu lado descobrindo a vida. Espero que eu tenha sido um bom exemplo para vocês, que, apesar da contradição, são espelhos para mim. Obrigada por todo o carinho, apoio e amizade de todos esse anos. Vocês são meus anjinhos, minhas eternas companheiras!

Ao meu namorado, por ter trilhado meu caminho em busca dessa realização, me encorajando e me orientado. É uma imensa satisfação poder compartilhar com você essa conquista . Obrigada por estar comigo em cada passo dessa caminhada.

Aos meus avós, tios e tias que, com seu ingênuo interesse pela minha futura profissão me proporcionaram o melhor sentimento que um profissional de saúde pode desfrutar: a satisfação de poder ajudar.

Aos meus amigos e colegas da T53, em especial Anne, Camila, Clízia, Karina, Marina, Patrícia e Thaís que, cada qual com sua importância tornaram esses quatro anos de minha vida memoráveis.

Às minhas parceiras de estágio clínico Lilian, Karen, Karina e Larissa que me acudiram nos momentos de sufoco, me deram forças e me fizeram contornar as dificuldades, injustiças e contradições do dia-a-dia.

Ao professor Edgard Graner, ao qual tenho grande admiração, por ter confiado a mim este projeto. E à minha inicialmente orientadora Michelle Agostini, pela paciência e dedicação que tornaram esse trabalho possível.

E por último, agradeço a Deus por ter me concedido a benção de ingressar numa universidade tão prestigiada como a Unicamp e por poder ter o privilégio de sonhar com um futuro de glória.

*É necessário ter o caos cá dentro para gerar uma estrela.*

*Friedrich Nietzsche*

## **RESUMO**

A enzima ácido graxo sintase (FASN) desempenha papel chave na lipogênese de células neoplásicas e está altamente expressa 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. Trabalhos prévios mostram que FASN é essencial para a proliferação de células derivadas de carcinomas espinocelulares (CECs) bucais humanos e que está expressa em maiores quantidades em CECs de boca do que no epitélio normal adjacente. Recentemente também foi demonstrado que a expressão elevada de FASN e ErbB2 em CECs bucais ocorre em tumores com maior espessura e comprometimento microscópico dos linfonodos. A inibição da atividade de FASN com RNA de interferência ou inibidores farmacológicos ocasiona efeitos antitumorais, dentre os quais, o aumento das taxas de apoptose e parada do ciclo celular em células de diferentes tipos de tumores malignos, diminuição do tamanho de tumores xenográficos de mama e próstata e diminuição do número de metástases regionais em modelo murino de melanoma. O presente projeto tem como objetivo investigar o efeito do inibidor da atividade de FASN cerulenina sobre a proliferação e morte nas linhagens celulares SCC-4, -9, -15 e -25, derivadas de CECs bucais humanos de língua.

## **PALAVRAS-CHAVE**

ciclo celular

morte celular

cerulenina

ácido graxo sintase

Carcinoma espinocelular bucal

## **ABSTRACT**

The fatty acid synthase enzyme (FASN) plays a key role in lipogenesis of neoplastic cells and it is highly expressed in several malignant human tumors. A large number of evidences suggests that FASN is a metabolic oncogene that plays a major role in growth and survival of tumor cells. Previous studies show that FASN is essential for proliferation of cells derived from human oral squamous cells carcinomas (SCC) and is expressed in large amounts in oral SCCs than in the adjacent normal epithelium. Recently it was also demonstrated that the overexpression of FASN and ErbB2 in oral SCCs occurs in tumors with higher thickness and affecting of lymph nodes, by microscopic view. The inhibition of FASN activity with interference RNA or pharmacological inhibitors causes antitumor effects, among them, increased rates of apoptosis and cell cycle arrest in cells from different kinds of malignant tumors, decreasing the size of breast and prostate xenographics tumors and decreasing of the number of regional metastasis in a murine model of melanoma. This project aims to investigate the effect of the FASN activity inhibitor cerulenin over the proliferation and death in cell lines SCC-4, -9 -15 and -25, derived from human oral and tongue SCCs.

## **KEYWORDS**

cellular cycle

cellular death

cerulenin

fatty acid synthase

squamous cell carcinoma



## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1 Ácido graxo sintase (FASN).....	10
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
2.1 Carcinoma espinocelular (CEC) bucal.....	11
2.2 CECs bucais e FASN.....	12
2.3 Cerulenina.....	13
2.4 Efeitos da inibição da atividade de FASN.....	13
<b>3. PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
4.1 Cultura de células.....	16
4.2 Preparo das soluções de Cerulenina .....	16
4.3 Citometria de fluxo .....	16
4.4 Forma de análise dos resultados .....	17
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
5.1 Características morfológicas das células SCC-9 e SCC-25...	17
5.2 Padronização das concentrações de cerulenina .....	19
5.3 Padronização do novo protocolo para a Anexina V .....	20
5.4 Efeitos da inibição da atividade de FASN com cerulenina .....	21
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>7.CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 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, 2000; Pizer et al., 2000; Baron et al., 2004; Stoops & Wakil, 1981). Em células normais, a atividade da FASN é mínima, pois a maior parte dos ácidos graxos utilizados é proveniente da dieta (Weiss et al., 1986; Kuhajda, 2000; Chirala et al., 2001). Entretanto, em tecidos altamente lipogênicos como fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões de recém nascidos, a biossíntese endógena de ácidos graxos torna-se aumentada (Kuhajda, 2000; Chirala et al., 2003).

Vários estudos mostram que FASN é altamente expressa em tumores malignos humanos de mama (Milgraum et al., 1997), ovário (Alò et al., 2000), próstata (Swinnen et al., 2000), endométrio (Pizer et al., 1998a), tireóide (Vlad et al., 1999), pulmão (Piyathilake et al., 2000), cólon (Visca et al., 1999), esôfago (Nemoto et al., 2001), estômago (Kusakabe et al., 2002), bexiga (Visca et al., 2003) e boca (Krontiras et al., 1999, Agostini et al., 2004, Silva et al., 2004; Silva et al., 2008a; Silva et al., 2008b). Além disso, a expressão elevada de FASN também foi encontrada em melanomas (Innocenzi et al., 2003; Kapur, et al., 2005) e sarcomas de tecidos moles (Takahiro et al., 2003; Rossi et al., 2006), em alguns casos estando 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; Liu et al., 2010). A alta atividade de FASN provavelmente gera vantagens que suportam o rápido crescimento das células malignas (Baron et al., 2004).

A expressão forçada de FASN em células epiteliais prostáticas imortalizadas (iPrEC) provoca o seu crescimento em “soft agar” e aumenta significativamente a proliferação (Migita et al., 2009). Já foi também demonstrado que o aumento da expressão de FASN parece acompanhar o desenvolvimento de metástases em um modelo murino transgênico de adenocarcinoma de próstata (Pflug et al., 2003). Nesse sentido, FASN vem sendo apontada como um oncogene e diversos trabalhos

indicam que a inibição de sua atividade mostra efeitos antitumorais significativos, o que faz desta enzima um alvo atrativo no combate ao câncer (Liu et al., 2010, Flavin et al., 2010).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Carcinoma espinocelular (CEC) bucal:**

De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) cerca de 14.120 novos casos de neoplasias malignas de boca foram estimados para o ano de 2010, dos quais aproximadamente 10.330 casos acometendo homens, sendo o tumor de maior prevalência o carcinoma espinocelular (INCA/Brasil 2010). Atualmente a incidência de câncer de boca no Brasil ocupa o quinto lugar entre o gênero masculino e o sétimo entre o feminino. Em 2008, aproximadamente 6.214 óbitos ocorreram no Brasil em decorrência desta doença e no estado de São Paulo, 3.230 novos casos foram estimados para o ano de 2010, o maior número dentre todos os Estados da Federação. Entre as neoplasias malignas da cavidade oral e orofaringe, mais de 90% correspondem aos carcinomas espinocelulares.

O tabagismo e o consumo de álcool constituem os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento desse tumor. A proporção homem/mulher é de 3:1, porém vem sendo observada uma diminuição dessa relação (Iamaroon et al., 2004; Scully & Felix, 2006). 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 do paciente (Greenberg et al., 2003; Sano & Myers, 2007).

De acordo com o Ministério da Saúde, 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 aos pacientes, os quais geralmente sofrem com as consequências de um tratamento cirúrgico mutilador e com os efeitos colaterais da radioterapia e da quimioterapia. Desta forma, a pesquisa de possíveis agentes quimiopreventivos e quimioterápicos que possam inibir a progressão deste tipo de câncer apresenta grande importância clínica.

## 2.2 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 <sup>14</sup>C nos lipídios totais sintetizados pelas amostras teciduais, que os CECs bucais produziram significativamente mais ácidos graxos do que os outros tecidos estudados. Em um trabalho subsequente, os mesmos autores mostraram que esta síntese é inibida por um inibidor natural da atividade de FASN, a cerulenina (Guo et al., 2003).

Um achado importante deste estudo foi o fato de que a cerulenina apresentou pouca atividade inibitória sobre a síntese de ácidos graxos nas amostras de tecido normal. Além disso, também foi 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 maior positividade para FASN ocorre nos CECs bucais bem diferenciados (Krontiras et al., 1999; Silva et al., 2004).

Estes achados são justificados com base em experimentos que mostram que a expressão de FASN é estimulada durante a diferenciação dos queratinócitos orais (Silva et al., 2008a). O papel essencial de FASN na proliferação de células derivadas de CECs bucais humanos foi demonstrado em trabalho prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, no qual observamos através de curvas de proliferação, que a inibição farmacológica desta enzima com cerulenina reduziu significativamente a proliferação de células SCC-9, derivadas de CECs bucais humanos (Agostini et al., 2004). Adicionalmente, a expressão de FASN em CECs de língua foi associada com características microscópicas que determinam progressão e prognóstico da doença (Silva et al. 2008b) e também já foi demonstrado que a expressão elevada de FASN e ErbB2 em CECs bucais ocorre em tumores com maior espessura e comprometimento microscópico dos linfonodos (Silva et al., 2009).

### **2.3 Cerulenina :**

FASN é considerada um alvo em potencial para a terapia antitumoral. Vários inibidores da atividade de FASN vêm sendo empregados em diversos estudos, sendo os mais utilizados a cerulenina, o C75 e o orlistat (Flavin et al., 2010). A cerulenina é um produto natural do fungo *Cephalosporium caerulens*. Cerulenina ou (2R, 3S) -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida 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 FASN através de sua ligação covalente no sítio da  $\alpha$ -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).

O tratamento com cerulenina produz 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., 1996a; Pizer et al., 1998b; Li et al., 2001; Wang et al., 2008, Haase et al., 2010), o que culmina com a morte por apoptose (Liet 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 triciada, que ocorreu profunda inibição da replicação do DNA duas horas após o início do tratamento. Cerulenina causa também a diminuição do tamanho de tumores em modelos xenográficos de câncer de ovário (Pizer et al. 1996b), e de meningioma (Haase et al., 2010). Um trabalho recente (Murata et al., 2010) mostrou que o número e o tamanho de tumores metastáticos de fígado foram significativamente reduzidos pelo tratamento com o inibidor de FASN cerulenina em modelo murino de carcinoma coloretal.

### **2.4 Efeitos da inibição da atividade de FASN :**

Vários trabalhos já demonstraram que a inibição de FASN, tanto farmacológica como através de RNAi, causa apoptose e 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., 1996a; Furuya et al., 1997; Pizer et al., 1998b; Kuhajda et al.,

2000, De Schrijver et al., 2003; Knowles et al., 2004). O trabalho de Carvalho et al. (2008), realizado por nosso grupo, demonstrou redução de cerca de 50% nas metástases espontâneas de melanomas experimentais pela inibição farmacológica de FASN com a droga orlistat, provavelmente devido ao bloqueio do ciclo celular e indução de apoptose. O fato de que a inibição de FASN atenua o crescimento tumoral e 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). Entretanto, os mecanismos regulatórios que ligam a inibição de FASN aos efeitos antitumorais ainda não foram completamente elucidados.

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. (1998b), não há efeito direto dos inibidores de FASN no DNA ou na maquinaria da replicação, mas sim sobre a regulação do ciclo celular. O efeito antitumoral 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, Haase et al., 2010), causando também supressão transcricional do gene ErbB2 (Menendez et al., 2004). Knowles & Smith (2007) mostraram que o silenciamento de FASN através de RNAi em células derivadas de câncer de mama além de afetar a transcrição de genes envolvidos no metabolismo tumoral, ocasiona super-regulação de genes que regulam a parada do ciclo celular e apoptose.

Em trabalho recente desenvolvido por pesquisadora de nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que nas células de melanoma murino B16-F10, a inibição de FASN com cerulenina ou com a droga orlistat inibe a proliferação e induz morte por apoptose, com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3. A morte induzida por orlistat é precedida por estresse oxidativo (EROs e da  $[Ca^{2+}]_{cit}$ ) e, em ambos os casos, a apoptose é independente da participação de p53, calcineurina ou abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Zecchin et al., 2010).

### 3. PROPOSIÇÃO

Os efeitos antitumorais consequentes da inibição da atividade de FASN fazem com que esta enzima seja apontada como um alvo promissor para o tratamento do câncer. Trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram expressão elevada de FASN em carcinomas espinocelulares (CECs) bucais, estando associada com características microscópicas que determinam progressão e prognóstico em CECs de língua e tumores com maior espessura e comprometimento microscópico dos linfonodos. Além disso, resultados prévios de um projeto em andamento em nosso laboratório (FAPESP 2008/55548-2) indicam que a inibição da atividade de FASN com a droga orlistat em modelo murino de CEC bucal é capaz de provocar diminuição do número e tamanho das metástases para linfonodos regionais.

Em experimentos deste mesmo projeto verificamos que o tratamento com a droga orlistat induziu parada significativa do ciclo celular em células derivadas de carcinoma espinocelular bucal humano (SCC-4, -9, -15 e -25) cultivadas nas condições padrão de cultura, em meiocontendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Entretanto, aumento das taxas de apoptose foi verificado apenas quando as estas células foram cultivadas em meio com concentração reduzida de SFB (2%). Em trabalho prévio (Agostiniet al. 2004) já havíamos demonstrado que FASN é essencial para a proliferação das células SCC-9, o que foi verificado através de curvas de proliferação após o tratamento destas células com cerulenina.

Os mecanismos pelos quais a cerulenina provocou a diminuição da proliferação nestas células ainda não estão totalmente elucidados. O presente projeto pretende investigar os efeitos da cerulenina sobre o ciclo celular e morte nas células SCC-9 e -25. Os resultados dos experimentos propostos no presente projeto, em conjunto com os resultados já obtidos em nosso laboratório com a droga orlistat, serão importantes para uma melhor compreensão dos efeitos de dois inibidores distintos da atividade de FASN (os quais atuam em diferentes sítios catalíticos da enzima), sobre proliferação e morte de células derivadas de CECs bucais humanos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Cultura de células:**

A linhagem celular SCC-9, proveniente de CEC bucal humano e adquirida da American Type Culture Collection (ATCC, E.U.A.) foi cultivada 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 (Sigma) 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.

Os 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 se separam do assoalho do frasco e a inativação da tripsina feita pela adição de 5- 10 ml de meio de cultura DMEM-F12 com 10% de FBS. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml (Corning, E.U.A.) e estes centrifugados a 3000 rpm por 3 min. Os “pellets” foram ressuspensos em 5 ml de meio de cultura DMEM-F12 com 10% de FBS, as células contadas e re-plaqueadas 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, cerulenina foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 2,5 ug/ml, 5 ug/ml e 7,5 ug/ml, sendo nos controles utilizado volume de DMSO equivalente ao da concentração de 7,5 ug/ml.

**4.2 Preparo das soluções de Cerulenina:** para o preparo da solução estoque, cerulenina (Sigma) foi diluída em DMSO na concentração de 20 mg/ml.

**4.3 Citometria de fluxo:** cerca de 10.000 eventos de cada mostra foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson). As populações celulares foram identificadas por suas características de tamanho, granulosidade e rugosidade de membrana e analisadas separadamente por intensidade de fluorescência dos marcadores específicos.



**4.3.1 Análises do ciclo celular:** A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo. Após 24 h de plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por novo meio sem adição de FBS e as células foram incubadas por mais 48h, quando teve início o tratamento com 2,5 ug/ml, 5 ug/ml e 7,5 ug/ml de cerulenina por 48 horas. As células foram coletadas, fixadas em etanol 70% gelado por no mínimo 16 hs a -20°C, lavadas em PBS gelado e tratadas com 10 µg/mL de RNase (Sigma) a 37°C durante 1 h. Em seguida as células foram coradas com 50 µg/mL de iodeto de propídeo a 4°C por 2 h e analisadas através de citometria de fluxo, em canal FL2. A análise da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi realizada no software ModFit (Verity Software House, E.U. A.).

**4.3.2 Avaliações das taxas de apoptose e necrose:** A porcentagem de células em apoptose e necrose foi determinada por citometria de fluxo, nos canais FL1 e FL3, após a marcação com Anexina V (Caltag) ou 7-AAD, respectivamente. Após os tratamentos, as células foram incubadas com Anexina V-FITC (Anexina V Invitrogen 1:500, Anexina V BD 1:100) em tampão de ligação contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>, no escuro, por 20 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação, os “pellets” foram lavados em tampão de ligação, novamente centrifugados e finalmente fixados em tampão de ligação contendo 0,1% paraformaldeído.

Para a marcação com 7-AAD, após o tratamento, as células foram coletadas e incubadas com solução de PBS contendo 7-AAD (1:100) e incubadas por 20 minutos no escuro, a temperatura ambiente, os pellets foram então lavados 2 x com PBS e as células fixadas em PBS contendo 0,1% paraformaldeído. As amostras foram armazenadas a 4° C até o momento da leitura. A aquisição e análise foram realizadas através do software CellQuest (Becton Dickinson).

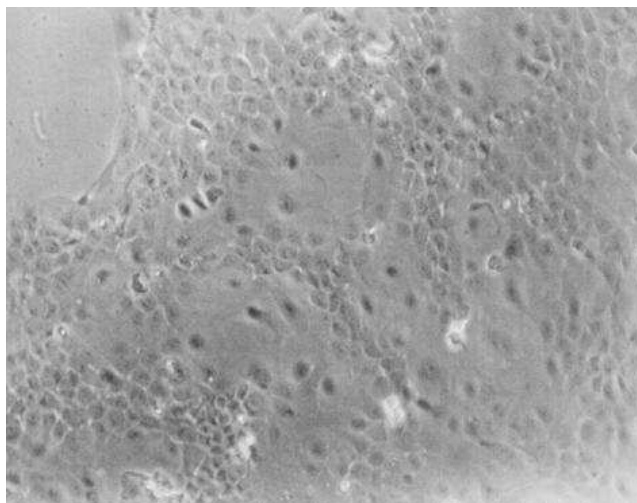
**4.4 Forma de análise dos resultados:** A significância estatística dos resultados foi verificada através do teste T. O nível de significância adotado foi de 5%.

## **5. RESULTADOS**

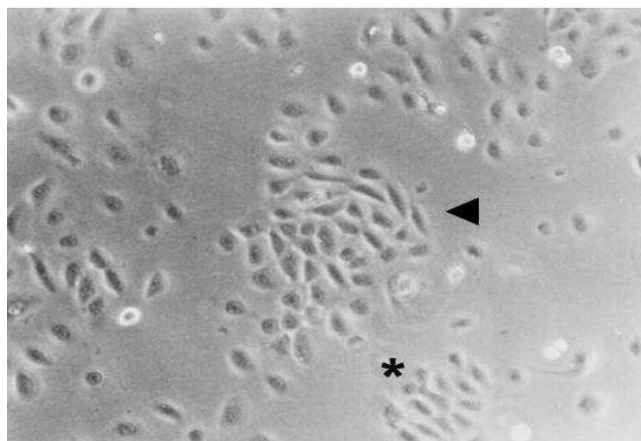
**5.1 Características morfológicas das células SCC-9 e SCC-25 e número de células utilizado nos experimentos**

Na Figura 1 é possível observar a morfologia da linhagem SCC-9, a qual é composta por células arredondadas, núcleos grandes com nucléolos bastante evidentes e poucas células multinucleadas. Esta linhagem apresenta um padrão de crescimento em rede, sendo necessário um tempo de tripsinização de 8 minutos para soltá-las dos frascos de cultura.

A Figura 2 mostra as SCC-25 em cultura, onde é possível observar células pequenas, com citoplasma escasso, núcleo grande e nucléolos evidentes, com aspecto variando de arredondado a fusiforme, com padrão de crescimento em grumos. As células SCC-25 se soltam mais facilmente dos frascos de cultura do que a linhagem SCC-9, sendo necessário um tempo de tripsinização de aproximadamente 5 minutos.



**Figura 1** – Aspecto morfológico da linhagem celular SCC-9, demonstrando o padrão de crescimento característico em rede.

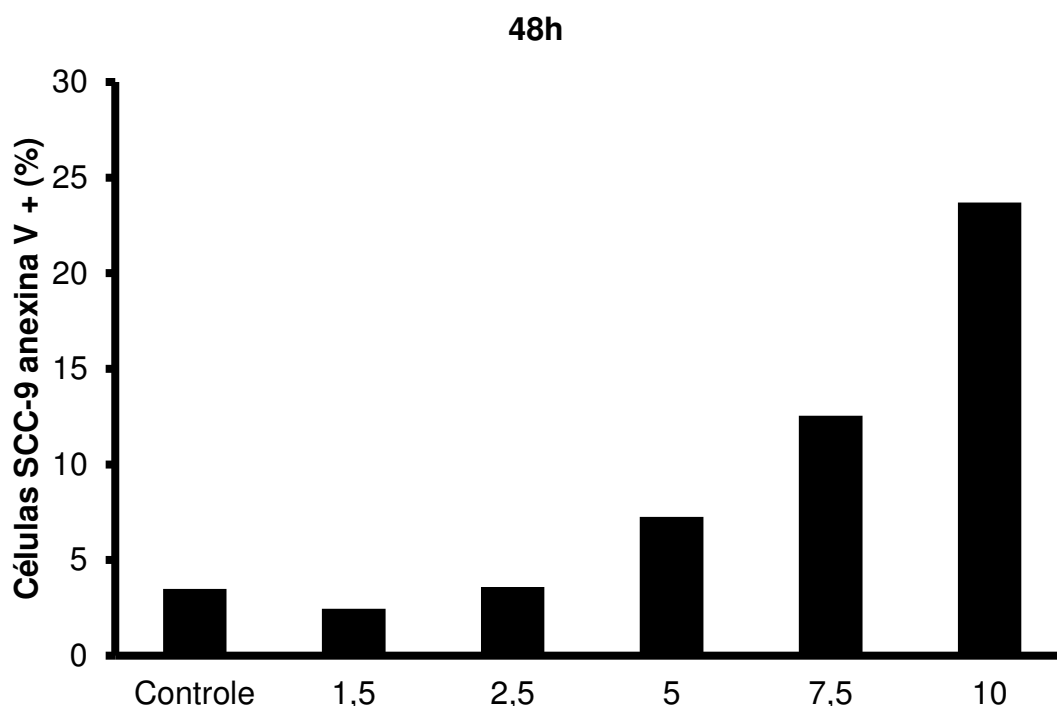


**Figura 2** – Aspecto da linhagem celular SCC-25 demonstrando a morfologia fusiforme (◄) com típico crescimento em grumos (\*).

Para que fossem analisadas no citômetro de fluxo para os experimentos de ciclo e morte celular, foi necessário estabelecer um número ideal de células para cada tempo de tratamento. Após a realização de experimentos piloto, estabelecemos que o número ideal de células foi de  $2 \times 10^5$  células para o período de 48 horas e  $1,5 \times 10^5$  células para o período de 72 horas de tratamento, as quais foram plaqueadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> para todos os experimentos realizados.

## 5.2 Padronização das concentrações de cerulenina

Experimentos piloto foram realizados para análise das taxas de apoptose foram realizados no laboratório para a determinação das melhores concentrações de cerulenina a serem utilizadas nos ensaios com as células SCC-9. As concentrações de 1,5 ug/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 7,5 µg/ml e 10 ug/ml foram testadas. O resultado de um destes experimentos pode ser observado na Figura 2. DMSO, o veículo utilizado na diluição da cerulenina, foi utilizado como controle com o volume equivalente ao da maior concentração (10 µg/ml). A partir destes resultados, foi estabelecido que as concentrações ideais de cerulenina para a realização dos experimentos eram de 2,5 ug/ml a 7,5 ug/ml, uma vez que a concentração de 1,5 ug/ml mostrou resultados semelhantes a concentração de 2,5 ug/ml e a concentração de 10 ug/ml apresentou taxas de apoptose muito elevadas.

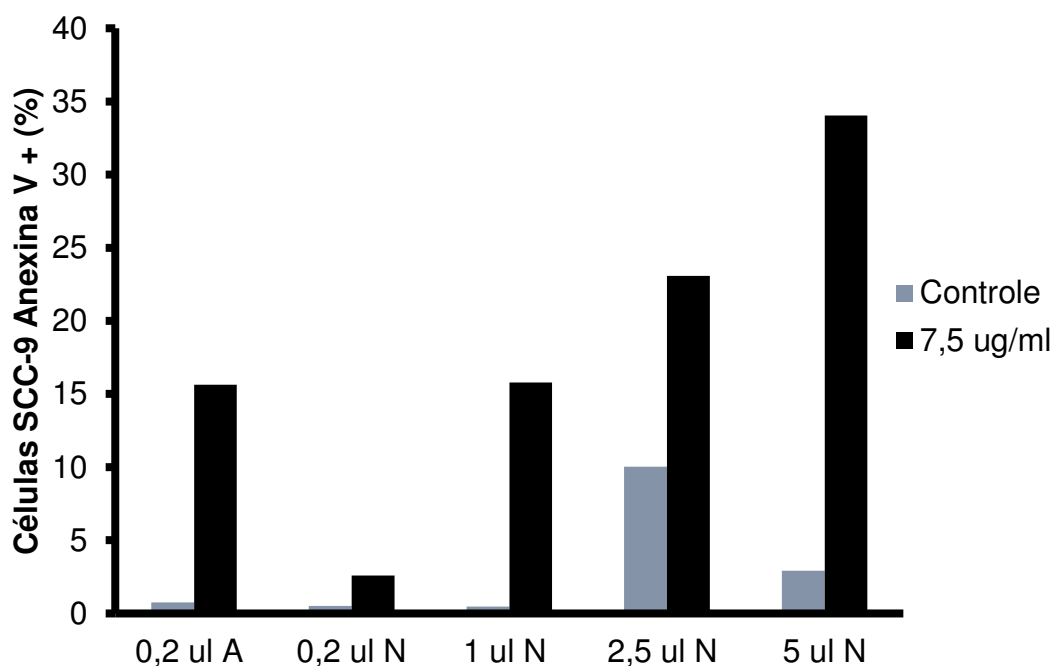


**Figura 2** – Análise da porcentagem de células SCC-9 positivas para anexina V por citometria de fluxo após tratamento com 1,5 a 10 ug/ml de cerulenina por 48 horas. Foi observado aumento significativo das taxas de apoptose nas células tratadas na presença de 5 a 10 ug/ml de cerulenina.

### 5.3 Padronização do novo protocolo para a Anexina V

Durante o desenvolvimento do projeto, o laboratório recebeu uma nova Anexina V. A Anexina V que vinha sendo utilizada até então, da marca Invitrogen, teve uso descontinuado no mercado, e, portanto, foi adquirido produto similar da empresa BD Biosciences, havendo necessidade de padronização de novo protocolo de marcação. Quando foi realizado o primeiro teste com a Anexina recém adquirida, com o protocolo utilizado anteriormente, verificamos que o padrão de marcação era diferente. Portanto, a bolsista realizou experimento onde as células SCC-9 foram tratadas com 7,5 ug/ml de cerulenina ou o veículo DMSO, utilizando a quantidade padrão da Anexina antiga (0,2 ul) e diferentes volumes da Anexina nova (0,2 a 5 ul) em 100 ul do tampão de amostra. Após a realização deste experimento, constatamos que deveríamos utilizar 1 ul da Anexina nova para reproduzirmos os

resultados obtidos com 0,2 ul da Anexina antiga. Este resultado pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 3.



**Figura 3** – Padronização da concentração ideal da Anexina V nova (N) para marcação celular e análise das taxas de apoptose por citometria de fluxo. Foram utilizados os volumes de 0,2 ul a 5 ul da Anexina V nova e 0,2 ul da Anexina V antiga. É possível observar que o resultado que mais se assemelhou ao resultado obtido com a marcação da Anexina V antiga foi com o volume de 1 ul da Anexina V nova.

## 5.4 Efeitos da inibição da atividade de FASN com cerulenina

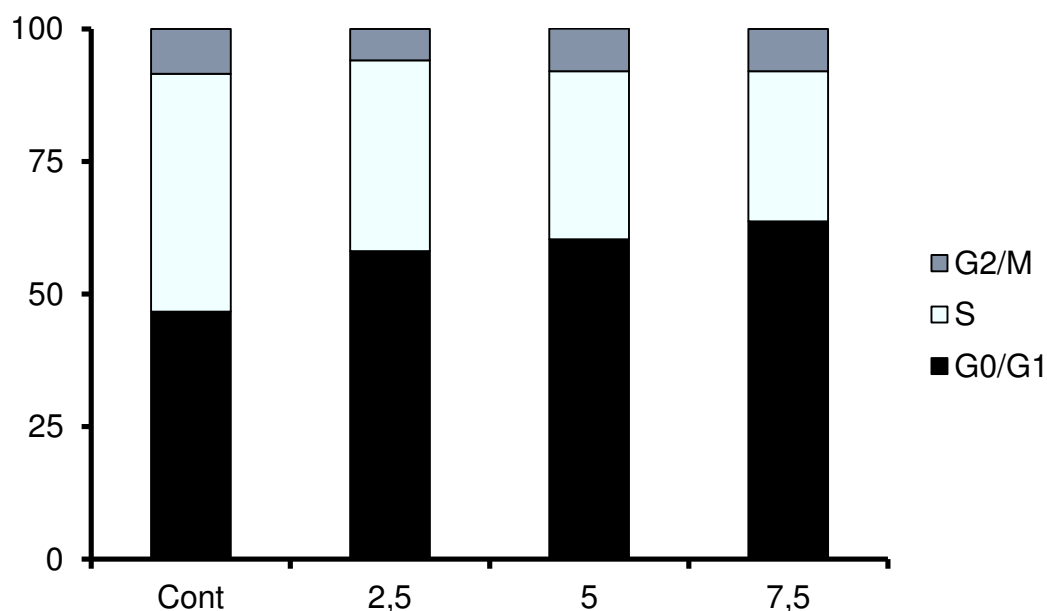
### 5.4.1 Proliferação celular das linhagem SCC-9 e SCC-15

O efeito da inibição de FASN com cerulenina sobre a proliferação das células SCC-9 e SCC-25 foi avaliado através de experimentos de citometria de fluxo. Vinte e quatro horas depois de semeadas em garrafas T25 em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), as células foram mantidas em DMEM/F-12 desprovido de FBS pelo período de 48 horas. A seguir, foram tratadas com 2,5, 5 ou 7,5 ug/ml de cerulenina em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% FBS por mais 48 hs.

As células controle foram tratadas com o veículo DMSO, no volume equivalente à maior concentração de cerulenina utilizada. As células foram então coletadas, fixadas em etanol a 70% gelado por 16h a -20°C, sendo então lavadas em PBS gelado e tratadas com 10 µg/mL de RNase. Em seguida, foram coradas com iodeto de propídeo e analisadas em citômetro de fluxo.

Nos experimentos com a linhagem SCC-9, observamos um aumento gradual das populações celulares em G0-G1 e um declínio do número de células na fase S do ciclo celular nos grupos de células tratadas com cerulenina em comparação com as células dos grupos controles. A intensidade de inibição da fase S foi diretamente proporcional a dose de cerulenina utilizada, sendo observada redução de aproximadamente 37% no número de células na fase S nas células tratadas com 7,5 ug/ml de cerelunenina.

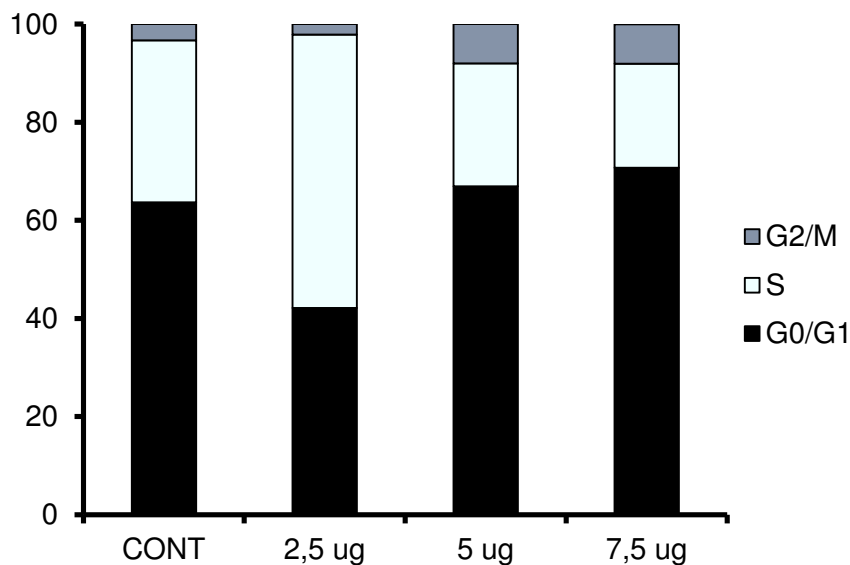
Este resultado pode ser observado na Figura 4, a qual mostra o gráfico representativo das médias de três experimentos independentes. Apesar da redução do número de células na fase S, não foi observada diferença estatisticamente significativa através do teste t de *Student*. O desvio padrão apresentou valores altos, o que pode justificar a falta de significância estatística.



**Figura 4** – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células SCC-9 tratadas com 2,5, 5 ou 7,5µg/ml de cerulenina por 48 horas. Observa-se redução do número de células

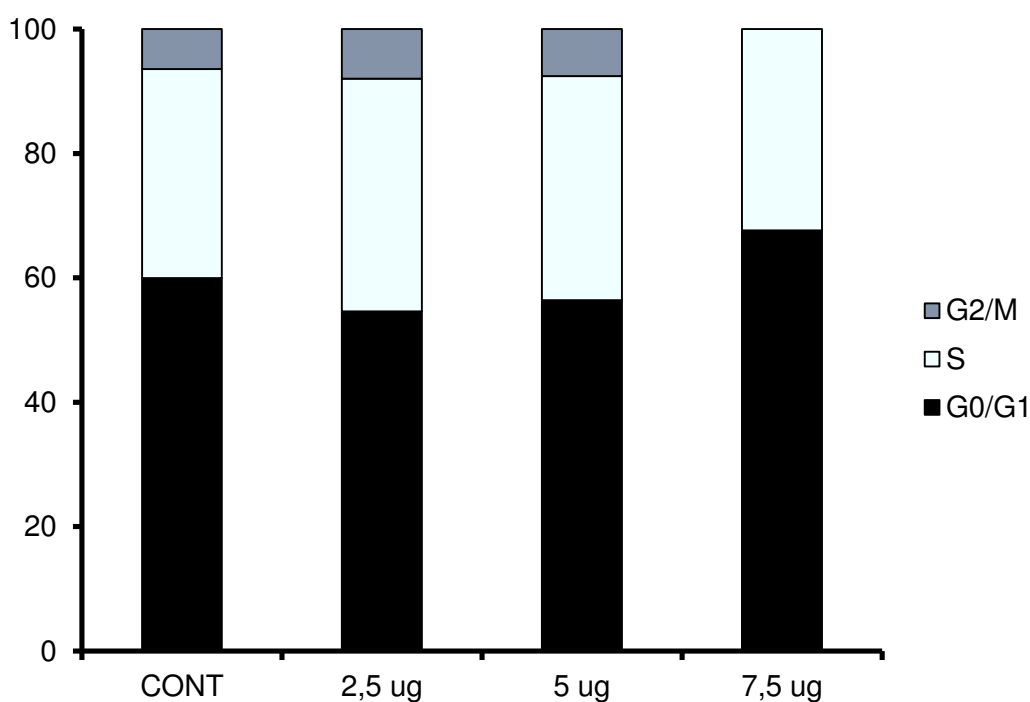
na fase S e aumento do número de células na fase G0/G1 do ciclo celular com cerulenina, em relação ao grupo controle. Médias de 3 experimentos independentes.

Foram realizados dois experimentos independentes para análise do ciclo celular das células SCC-9 tratadas com cerulenina por 72 horas. No entanto, os resultados do primeiro não reproduziram os achados anteriores do período de tratamento de 48 horas. No segundo ensaio (Fig 5), houve diminuição da porcentagem de células na fase S com 5 e 7,5 ug/ml de cerulenina. No entanto, as células tratadas com 2,5 ug/ml exibiram aumento do número de células na fase S, em comparação com as células controle. Além disso, de acordo com a experiência prévia do nosso grupo em outros experimentos com a linhagem SCC-9, esperávamos um número maior de células controles em S.



**Figura 5** – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células SCC-9 tratadas com 2,5, 5 ou 7,5µg/ml de cerulenina por 72 horas.

Foram realizados três experimentos independentes para a análise de ciclo celular das células SCC-25 tratadas com as concentrações de cerulenina nos períodos de 48 horas e 72 horas. No entanto, os resultados obtidos foram diferentes do esperado, considerando-se a experiência prévia do nosso grupo. Na Figura 5 observa-se um destes ensaios, no qual houve redução da fase S do ciclo celular apenas com 7,5 ug/ml da droga, além da redução de G2/M. Neste grupo de experimentos foi observada uma porcentagem menor do que a usual de células do grupo controle na fase S do ciclo celular, de acordo com a experiência de nosso grupo em outros experimentos realizados com esta linhagem celular.

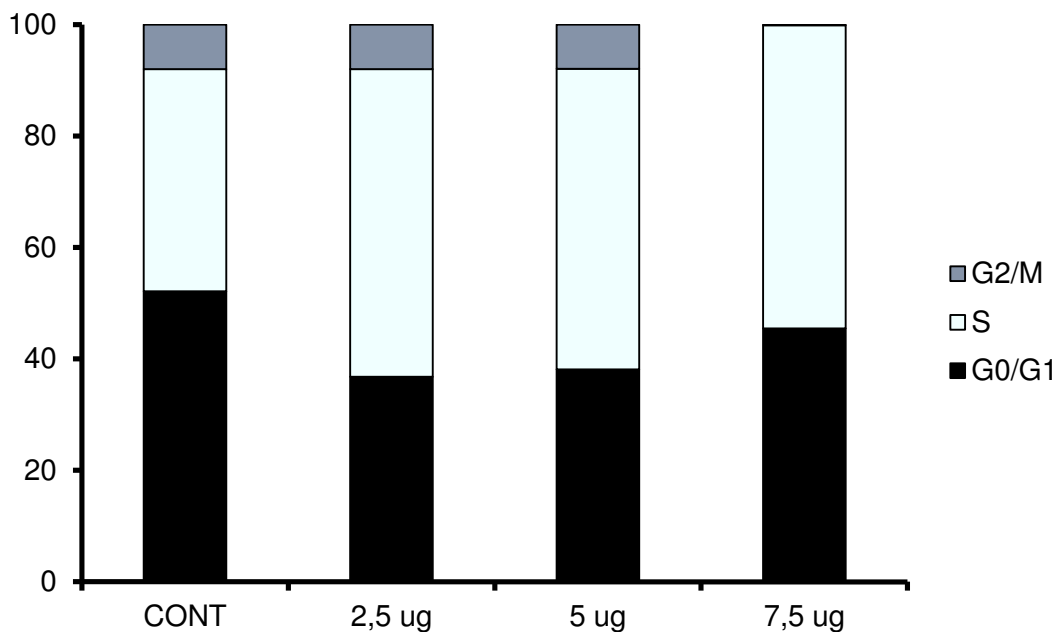


**Figura 6** – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células SCC-25 tratadas com 2,5 , 5 ou 7,5µg/ml de cerulenina por 48 horas.

Nos três experimentos realizados por 72 horas, houve também grande variação e, de maneira geral não ocorreu redução do ciclo celular (Fig 7). Os gráficos obtidos durante a aquisição destas células no citômetro de fluxo



demonstraram populações celulares com excesso de debris. É importante salientar que não foram detectados problemas nos experimentos durante as etapas de tratamento e coleta das células, em todos os experimentos apresentados no presente relatório. Por esta razão, acreditamos que algumas das inconsistências ocorreram em decorrência do longo tempo em que estas permaneceram fixadas, antes das leituras.

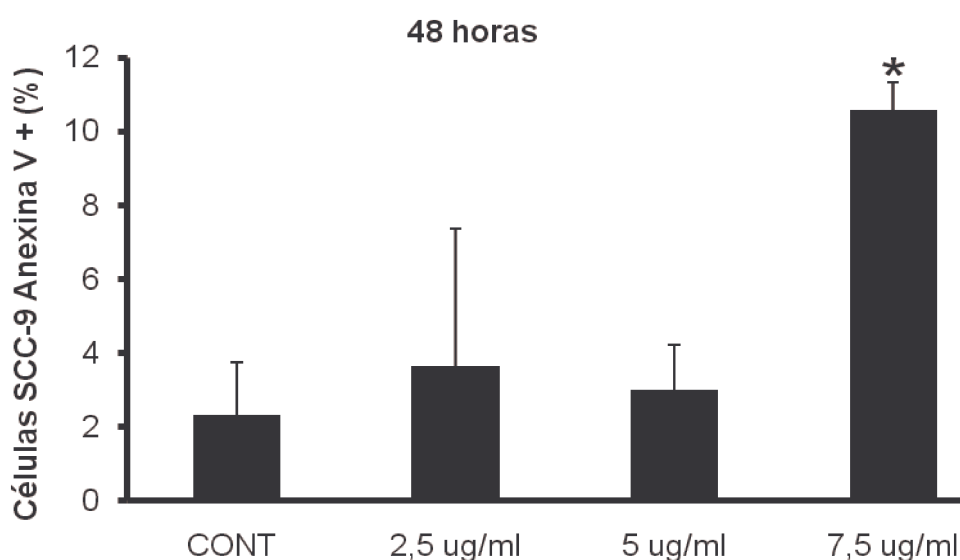


**Figura 7** – Análise do ciclo celular por citometria por fluxo em células SCC-25 tratadas com 2,5, 5 ou 7,5µg/ml de cerulenina 72 horas.

#### 5.4.2 Taxas de apoptose e necrose nas células SCC-9

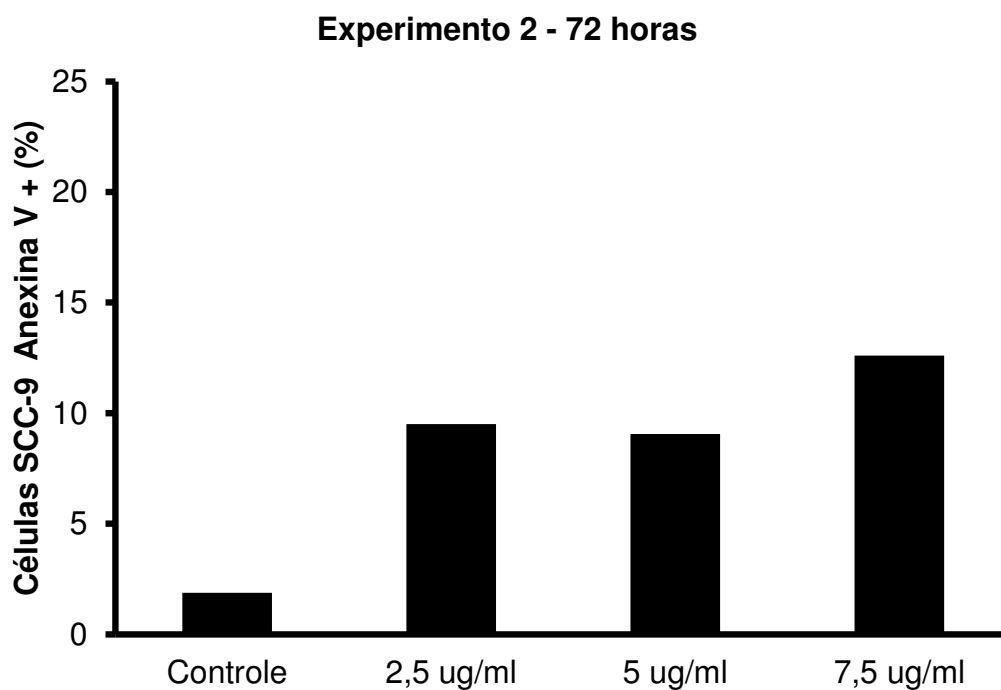
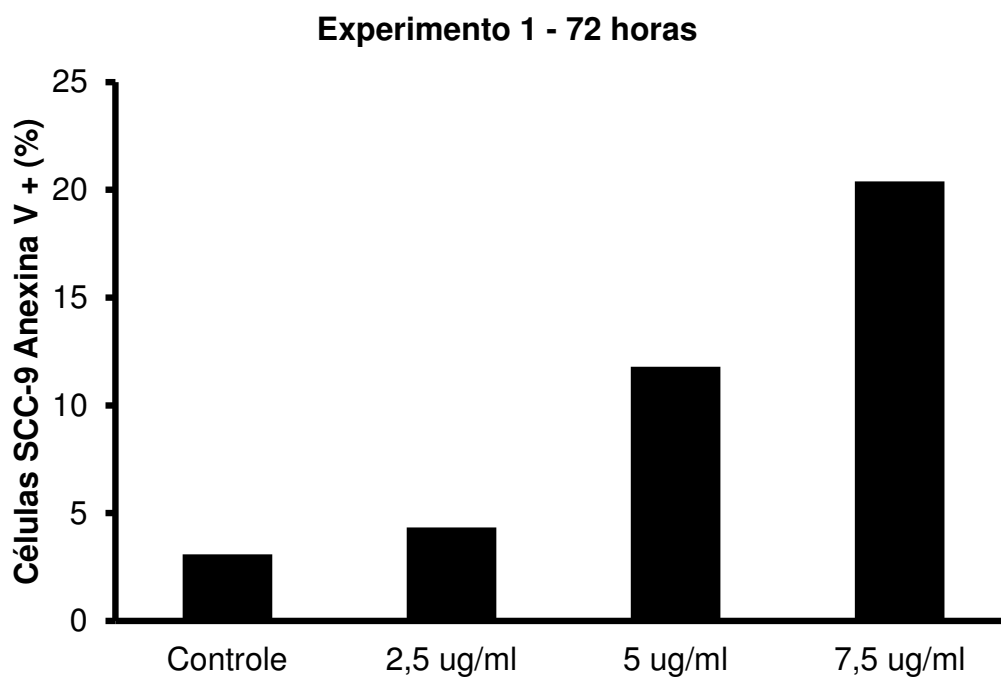
Para a avaliação das taxas de apoptose das células SCC-9 tratadas com cerulenina,  $2 \times 10^5$  células foram plaqueadas em garrafas T25. Vinte e quatro horas após o plaqueamento as células foram tratadas com 2,5 ug/ml, 5 ug/ml ou 7,5 ug/ml de cerulenina em meio DMEM/F-12 na presença de 10% SFB pelos períodos de 48 e 72 horas. As células controle foram tratadas com DMSO no mesmo volume equivalente à maior concentração de cerulenina utilizada. As células foram, então,

incubadas com Anexina V-FITC por 20 minutos, fixadas em tampão de ligação contendo 0,1% paraformaldeído e analisadas em citômetro de fluxo no canal FL-1. Foram realizados três experimentos independentes para o período de tratamento de 48 horas, sendo observada aumento de aproximadamente 5x na taxa de apoptose das células tratadas com 7,5 ug/ml de cerulenina em comparação com o grupo controle, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste t de *Student*). Este resultado pode ser observado na Figura 5.



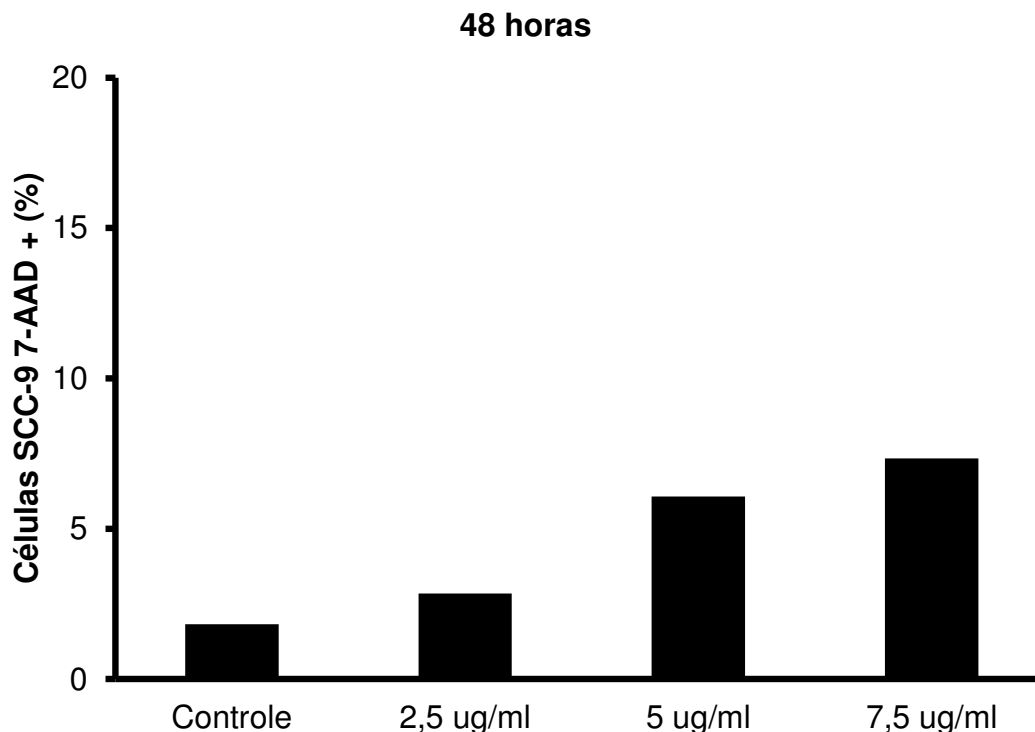
**Figura 8** – Análise da porcentagem de células SCC-9 positivas para anexina V por citometria de fluxo após tratamento com 2,5ug/ml, 5 ug/ml e 7,5ug/ml de cerulenina por 48 horas. Foi observado aumento de aproximadamente 5x na taxa de apoptose do grupo de células tratado com 7,5 ug/ml de cerulenina. \* $p < 0,05$ , teste t de *Student*. O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes

Foi obtido até o momento o resultado de dois experimentos independentes para o período de 72 horas. Nestes experimentos também verificamos aumento nas taxas de apoptose, que no experimento 1 ocorreu nas concentrações de 5 ug/ml e 7,5 ug/ml de cerulenina. Já no experimento 2 houve aumento das taxas de apoptose nas três concentrações utilizadas. Estes resultados podem ser observados na Figura 9.



**Figura 9** – Os gráficos correspondem aos resultados dos experimentos 1 e 2 dos experimentos para a análise de apoptose nas células SCC-9 tratadas com cerulenina nas concentrações de 2,5 ug/ml, 5 ug/ml e 7,3 ug/ml pelo período de 72 horas, onde foi observado aumento nas taxas de apoptose, principalmente nas concentrações de 5 ug/ml e 7,5 ug/ml.

Nestes experimentos de análise das taxas de apoptose, a dupla marcação com 7-AAD não foi realizada, pois ainda não havíamos recebido o reagente no laboratório. Quando o reagente foi recebido, iniciamos os experimentos de padronização da marcação isolada de 7-AAD. Para a avaliação das taxas de necrose,  $2 \times 10^5$  células SCC-9 foram plaqueadas em garrafas T25. Vinte e quatro horas após o plaqueamento as células foram tratadas com 2,5 ug/ml, 5 ug/ml ou 7,5 ug/ml de cerulenina em meio DMEM/F-12 na presença de 10% SFB pelo período de 48 horas. As células controle foram tratadas com DMSO no mesmo volume equivalente à maior concentração de cerulenina utilizada. As células foram então incubadas em PBS contendo 7-AAD (1:100) por 20 minutos, sendo então lavadas 2 vezes com PBS e fixadas em PBS contendo 0,1% paraformaldeído. A análise foi realizada em citômetro de fluxo no canal FL-3. A Figura 10 mostra o resultado do primeiro experimento realizado, onde observamos aumento na taxa de necrose das células tratadas com cerulenina, sendo o aumento dose dependente.



**Figura 10**– Análise da porcentagem de células SCC-9 positivas para 7-AAD por citometria de fluxo após tratamento com 2,5ug/ml, 5 ug/ml e 7,5ug/ml de cerulenina por 48 horas. Foi observado aumento nas taxa de apoptose nas células tratadas com cerulenina, o qual foi dose dependente

## 6. DISCUSSÃO

A cerulenina é um produto natural do fungo *cefalosporium caerulens*. *Cerulenina* ou (2R, 3S) –2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida 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 FASN através de sua ligação covalente no sítio da  $\beta$ -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) e apresenta propriedades antitumorais e anti-proliferativas (Pizer *et al.*, 1996; Haase *et al.*, 2010).

A inibição de FASN atenua o crescimento tumoral e proliferação de forma significativa, sugerindo 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). Os mecanismos regulatórios que ligam a inibição de FASN aos efeitos antitumorais ainda não foram elucidados. 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). Knowles & Smith, 2007 demonstraram que o silenciamento de FASN através de RNAi em células derivadas de câncer de mama além de afetar a transcrição de genes envolvidos no metabolismo tumoral, ocasiona super-regulação de genes que regulam a parada do ciclo celular e apoptose.

Em trabalho recente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que nas células de melanoma murino B16-F10, a inibição de FASN com cerulenina ou com orlistat inibe a proliferação e induz morte por apoptose, com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3. A morte induzida por orlistat é

precedida por estresse oxidativo (EROs e da  $[Ca^{2+}]_{cit}$ ) e, em ambos os casos, a apoptose é independente da participação de p53, calcineurina ou abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Zecchin *et al.*, 2010).

Em trabalho prévio realizado por nosso grupo de pesquisa (Agostini *et al.*, 2004), demonstramos, através de curvas de proliferação, que o tratamento das células com o inibidor de FASN cerulenina foi capaz de reduzir significativamente o índice de proliferação. Ocorreu a diminuição da síntese de DNA, inibição da progressão para a fase S do ciclo celular e morte por apoptose em células tumorais em cultura (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1996a; Pizer *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008, Haase *et al.*, 2010).

Em células derivadas de carcinoma de colon (HCT116) tratadas com cerulenina, ocorreu profunda inibição da replicação do DNA duas horas após o início do tratamento através da incorporação de timidina triciada, (Pizer *et al.* (1998b)). Cerulenina causa também a diminuição do tamanho de tumores em modelos xenográficos de câncer de ovário (Pizer *et al.* 1996b), e de meningioma (Haase *et al.*, 2010). Um trabalho recente (Murata *et al.*, 2010) mostrou que o número e o tamanho de tumores metastáticos de fígado foram significativamente reduzidos pelo tratamento com o inibidor de FASN cerulenina em modelo murino de carcinoma coloretal.

Nos CECs bucais, a expressão de FASN está diretamente associada com a sobrevida geral e características microscópicas que influenciam a progressão tumoral e o prognóstico, tais como invasão linfática, infiltração perineural e metástases linfonodais (Silva *et al.*, 2008b). A cerulenina inibe irreversivelmente a atividade da enzima ácido graxo sintase (FASN) através de sua ligação covalente no sítio da  $\beta$ -cetoacil sintetase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (Pizer *et al.*, 1998; Kuhajda *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2003), e apresenta propriedades antitumorais e anti-proliferativas (Pizer *et al.*, 1996; Haase *et al.*, 2010). Sabe-se que a diminuição da síntese de DNA, inibição da progressão para a fase S do ciclo celular e morte por apoptose são consequências da inibição de FASN com cerulenina em células tumorais em cultura (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1996; Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008, Haase *et al.*, 2010).

Demonstramos que o tratamento com cerulenina provocou inibição significativa da progressão do ciclo celular das células SCC-9, derivadas de um CEC de língua humano. Este fenômeno foi caracterizado pelo acúmulo de células nas fases G0/G1 e redução da porcentagem de células na fase S. FASN é a enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos, cuja expressão e atividade encontram-se elevadas em diversos tipos de câncer (Kuhajda, 2006), incluindo o CEC bucal (Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008a). O tratamento das células SCC-9 com cerulenina também provocou aumento das taxas de apoptose em diferentes tipos de células tumorais malignas, como as de mama (Pizer *et al.*, 1996; Menendez *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006), próstata (Furuya *et al.*, 1997; Swinnen *et al.*, 2004), cólon (Li *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2010), glioma (Zao *et al.*, (2006), melanoma (Ho *et al.*, 2007) e mieloma múltiplo (Okawa *et al.*, 2008). Nossos resultados estão de acordo com os de Zhang *et al.* (2005) que demonstraram que o tratamento com cerulenina foi capaz de induzir apoptose nas células TCA-83, derivadas de carcinoma espinocelular oral.

Se confirmados, nossos resultados também se mostrarão de acordo com os outros experimentos que estão em andamento no nosso laboratório. Por exemplo, uma linhagem celular derivada de SCC-9 denominada SCC-9 25 green LN-1, quando injetada na língua de camundongos imunossuprimidos ( Bdb-C/ nude), provocam tumores extremamente agressivos localmente e altamente metastáticos, invadindo os linfonodos da região com injeção de orlistat (inibidor da atividade de FASN), mostraram redução de 43% no número de metástase , além de redução significativa do volume dos tumores primários. Orlistat também se mostrou eficiente ao reduzir em 50% o número de metástase de melanomas experimentais (Carvalho *et al.* 2008) devido, muito provavelmente , á redução do ciclo celular e aumento das taxas de apoptose destas células..

## **7 .CONCLUSÕES**

**7.1** O tratamento das células SCC-9 derivadas de um CEC de língua humano com cerulenina provocou inibição da progressão do ciclo celular, caracterizado pelo acúmulo de células nas fases G0/G1 e redução da porcentagem de células na fase S, a qual foi aparentemente dose-dependente.

**7.2** Aumento nas taxas de apoptose e necrose foi observado quando as SCC-9 células foram tratadas com cerulenina

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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.

Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel ALCA, Veiga SS, Raposo HF, Oliveira HCF, Loda M, Coletta RD, Graner E. 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.

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.

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.

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.

Haase D, Schmidl S, Ewald C, Kalff R, Huebner C, Firsching R, Keilhoff G, Evert M, Paulus W, Gutmann DH, Lal A, Mawrin C. Fatty acid synthase as a novel target for meningioma therapy. *Neuro Oncol.* 2010; 12(8): 844-54.



Ho TS, Ho YP, Wong WY, Chi-Ming Chiu L, Wong YS, Eng-Choon Ooi V. Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother.* 2007;61(9):578-87.

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): 30540-30545.

[Knowles LM, Smith JW.](#) Genome-wide changes accompanying knockdown of fatty acid synthase in breast cancer. *BMC Genomics.* 2007; 8: 168.

Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition.* 2000a; 16(3): 202-8.

Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res* 2006; 66: 5977-80.

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 cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res.* 2001; 61(4): 1493-99.

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

Menendez JA, Colomer R, Lupu R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity enhances vinorelbine (Navelbine)-induced cytotoxicity and apoptotic cell death in human breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2004;12(2):411-22.

[Menendez JA, Vellon L, Lupu R.](#) Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of

apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol.* 2005a; 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.

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

Okawa Y, Hideshima T, Ikeda H, Raje N, Vallet S, Kiziltepe T, Yasui H, Enatsu S, Pozzi S, Breitkreutz I, Cirstea D, Santo L, Richardson P, Anderson KC. Fatty acid synthase is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2008; 141(5):659-71.

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, Chrest FJ, Diguseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res.* 1998; 58(20): 4611-5.

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.

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;40:688-96.

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;453:57-67.

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;14:376-82.

Swinnen JV, Heemers H, van de Sande T, de Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens, lipogenesis and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 92(4):273-9.

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.

Wang WQ, Zhao XY, Wang HY, Liang Y. Increased fatty acid synthase as a potential therapeutic target in multiple myeloma. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008; 9(6):441-7.

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. *Lab Invest*. 2011; 91(2): 232-40.

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

Zhao W, Kridel S, Thorburn A, Kooshki M, Little J, Hebbar S, Robbins M. Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy. *Br J Cancer*. 2006; 95(7):869-78.

## Anexo 1



### VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

<b>Processo</b>	2011/01100-3
<b>Linha de Fomento</b>	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
<b>Situação</b>	Em Execução
<b>Vigência</b>	01/06/2011 a 31/05/2012
<b>Beneficiário</b>	Ligia Rufo Spada
<b>Responsável</b>	Edgard Graner
<b>Vínculo Institucional do Processo</b>	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP

### Folha de Despacho

#### Datas do Despacho

<b>Emitido em / por:</b>	27/09/2012	Christian Giampietro Hauner
--------------------------	------------	-----------------------------

#### Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 2	29/06/2012	Aprovado

#### Observações / Transcrições / Frases

##### Observações ao Responsável

Comunicamos que seu Relatório Científico foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

Para visualizar o parecer, V.Sa. deve acessar o Sistema SAGe ([www.fapesp.br/sage](http://www.fapesp.br/sage)), clicar item do menu Processos/Meus Processos, clicando em Mais Informações "Consultar Despachos".

Atenciosamente,

Prof. Carlos Henrique de Brito Cruz  
Diretor Científico da FAPESP

##### OBSERVAÇÕES:

Obs.1: "A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador(a), sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o estudante candidato, o qual receberá uma cópia desta mensagem (sem transcrição do parecer)."

**Frases para o Responsável**

*Não há frases associadas.*

**Transcrição de Parecer para o Responsável****Parecer do Relatório Científico**

O trabalho foi adequadamente conduzido para um trabalho de Iniciação Científica, porém algumas estratégias de não foram alcançadas por problemas na execução de ensaios previstos inicialmente.

Há a necessidade de repetição de alguns ensaios como o próprio autor salientou.

**Conclusão**

O trabalho foi finalizado, porém faltaram alguns ensaios propostos inicialmente, o que não diminui a qualidade do mesmo. Desta forma, entendo que os objetivos, embora parcialmente alcançados, procuraram explicar e estão adequados a um trabalho de Iniciação Científica.

**Frases para Termo de Outorga**

*Não há frases associadas.*

**Relatório Científico 2 (Aprovado)**

<b>Compromisso</b>	10/06/2012
<b>Período Relacionado</b>	10/11/2011 a 31/05/2012
<b>Situação</b>	Atendido