



FERNANDA DOS SANTOS MOREIRA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA TERAPIA
COMBINADA ORLISTAT / CISPLATINA /
5-FLUOROURACIL / PACLITAXEL EM
LINHAGEM METASTÁTICA DE CARCINOMA
ESPINOCELULAR DE LÍNGUA**

**PIRACICABA
2014**



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

FERNANDA DOS SANTOS MOREIRA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA TERAPIA COMBINADA
ORLISTAT / CISPLATINA / 5-FLUOROURACIL /
PACLITAXEL EM LINHAGEM METASTÁTICA DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LÍNGUA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Estomatopatologia, na Área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Fernanda dos Santos Moreira e orientada pelo Prof. Dr. Edgard Graner.

Assinatura do orientador

**PIRACICABA
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

M813e Moreira, Fernanda dos Santos, 1986-
Estudo dos efeitos da terapia combinada orlistat / cisplatina / 5-fluorouracil /
paclitaxel em linhagem metastática de carcinoma espinocelular de língua /
Fernanda dos Santos Moreira. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Ácido graxo sintases. 2. Cisplatina. 3. 5-Fluorouracil. 4. Paclitaxel. I. Graner,
Edgard, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia
de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of combined therapy Orlistat / Cisplatin/ 5-Fluorouracil /
Paclitaxel in metastatic lineage of squamous cell carcinoma of the tongue

Palavras-chave em inglês:

Fatty acid synthases

Cisplatin

5-Fluorouracil

Paclitaxel

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Mestra em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Edgard Graner [Orientador]

Fábio de Abreu Alves

Marcio Ajudarte Lopes

Data de defesa: 28-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2014, considerou a candidata FERNANDA DOS SANTOS MOREIRA aprovada.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Edgard Graner".

Prof. Dr. EDGARD GRANER

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Fábio de Abreu Alves".

Prof. Dr. FÁBIO DE ABREU ALVES

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Marcio Ajudarte Lopes".

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

RESUMO

A ácido graxo sintase (FASN) é a principal enzima envolvida na lipogênese neoplásica e apontada como uma oncoproteína metabólica por favorecer o crescimento e sobrevivência das células tumorais, nas quais sua expressão é em geral elevada. Vários são os compostos capazes de inibir a atividade de FASN, dentre eles o orlistat (Xenical[®]), que possui efeitos antineoplásicos em cânceres de mama e próstata e nos melanomas. O carcinoma espinocelular (CEC) representa aproximadamente 90% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral, sendo diagnosticado em estágios avançados em grande parte dos casos. Nestes pacientes, geralmente com metástases, é realizada uma abordagem sistêmica com agentes quimioterápicos como a cisplatina, o 5-fluorouracil (5-FU) e o paclitaxel, de maneira isolada ou combinada. Este trabalho tem como objetivo investigar *in vitro* se cisplatina, 5-FU ou paclitaxel potencializam o efeito antitumoral do orlistat no CEC oral. Para isto, células de CEC de língua altamente metastáticas (SCC-9 LN1) foram tratadas com estas drogas isoladamente ou combinadas com orlistat e avaliadas com relação às taxas de apoptose e necrose, progressão do ciclo celular e secreção de VEGFA e VEGFA_{165b}. As maiores taxas de apoptose foram encontradas com o uso da combinação de orlistat com paclitaxel, após 48 horas de tratamento. Com relação ao ciclo celular, houve acúmulo de células na fase S com a combinação de orlistat com cisplatina e na fase G2 com a combinação de orlistat com paclitaxel. O tratamento das células SCC-9 LN1 com os agentes quimioterápicos reduziu a secreção dos fatores VEGFA e VEGFA_{165b}, em comparação ao tratamento com orlistat isolado ou em combinação. Em conjunto, estes resultados mostram a existência de sinergismo na combinação de orlistat com paclitaxel com evidente potencialização do efeito pró-apoptótico nas células derivadas de CEC oral metastático.

Palavras chave: Ácido graxo sintase. Orlistat. Cisplatina. 5-Fluorouracil. Paclitaxel.

ABSTRACT

Fatty acid synthase (FASN) is the main enzyme involved in the neoplastic lipogenesis. The expression of FASN is elevated in many tumor cells, suggesting a role as a metabolic oncoprotein, with the ability to promote growth and survival of tumor cells. There are several compounds that inhibit FASN activity, including orlistat. Orlistat has evident antineoplastic effects in breast and prostate cancers, as well as melanomas. Oral squamous cell carcinoma (OSCC), corresponds to approximately 90% of all cancers that affect the oral cavity, and is diagnosed in advanced stages in most cases. Distant metastases of OSCC are systemically treated with chemotherapeutic agents, such as cisplatin, 5-fluorouracil (5-FU) and paclitaxel. This study aims to investigate the *in vitro* antitumor effect of orlistat combined with cisplatin, 5-FU and/or paclitaxel in OSCC cells. Highly metastatic tongues squamous cell carcinoma cells (SCC-9-LN1) were treated with these drugs separately or combined with orlistat, in concentrations close to their respective IC₅₀. Next, the cultures were evaluated regarding the rates of cell death (apoptosis and necrosis), cell cycle progression and the secretion VEGFA and VEGFA_{165b}. The highest rate of apoptosis was observed with the combination of orlistat and paclitaxel, after 48 hours of treatment. Cell cycle analysis assay demonstrate as an accumulation of cells SCC-9 LN1 in the S phase, after incubation with the combination of orlistat with cisplatin, and in the G2 phase with orlistat plus paclitaxel. The 5-FU alone, promoted accumulation of cells in the G1/S. Additionally, secretion of VEGFA and was VEGFA_{165b} was inhibited in SCC-9-LN1 cells by the combined treatments. These results demonstrate the synergism existence of the mixture orlistat and paclitaxel with potentiation of their proapoptotic effects in SCC-9 LN1 cells.

Key Words: Fatty acid synthase. Orlistat. Cisplatin. 5-Fluorouracil. Paclitaxel.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 A enzima Ácido Graxo Sintase (Fatty acid synthase - FASN)	5
2.2 Os inibidores de FASN	10
2.3 O carcinoma Espinocelular (CEC) Oral	12
2.4 Tratamento do CEC oral	16
2.5 Cisplatina	17
2.6 5-Fluorouracil.....	20
2.7 Paclitaxel	22
2.8 Combinação de drogas na quimioterapia de CECs de cabeça e pescoço ..	24
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Cultura de células	31
4.2 Preparo das soluções de orlistat.....	32
4.3 Preparo dos quimioterápicos	32
4.4 Ensaio colorimétrico com cristal violeta	33
4.5 Cálculo do IC ₅₀ e análise do índice de combinação (CI).....	33
4.6 Avaliação das taxas de morte celular por apoptose e necrose.....	34
4.7 Análise do ciclo celular.....	35
4.8 Estudo da secreção de VEGFA e VEGFA _{165b} através de ELISA.....	35
4.9 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Efeitos citotóxicos e/ou de inibição do crescimento celular das drogas orlistat, cisplatina, 5-FU e paclitaxel nas células SCC-9 LN1. Determinação da IC ₅₀	37
5.2 Análise dos índices de sinergismo, antagonismo e de adição das combinações de orlistat com os quimioterápicos.....	40

5.3 Efeitos do orlistat, em associação com cisplatina, 5-FU ou paclitaxel na indução de morte celular.....	43
5.4 Efeitos do orlistat, dos quimioterápicos cisplatina, 5-FU, e paclitaxel, e das suas combinações sobre a progressão do ciclo celular.....	46
5.5 Avaliação dos efeitos do orlistat e das combinações sobre a secreção dos fatores VEGFA e VEGF165b nas células SCC-9 LN1	50
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	63
REFERENCIAS.....	65
ANEXO.....	107

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por todo amor, cuidado, suporte, apoio total em todas as minhas escolhas e por me mostrarem como batalhar pelos meus objetivos com honestidade e bondade.

Aos meus avós, pelo amor, momentos felizes e de sabedoria a mim proporcionados.

Ao meu filhote Schummy, pelo amor, carinho e alegria com o qual me recebe e faz ainda mais feliz as voltas para casa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer em todos os momentos e não me deixar desistir.

Ao meu orientador, professor doutor Edgard Graner, agradeço pelos preciosos ensinamentos ao longo deste período. Agradeço ainda por conviver com seu exemplo de pessoa humilde, paciente, dedicada e acima de tudo ética. Registro aqui toda a minha admiração e respeito.

À Luciana Yamamoto e Jorge León por todos os ensinamentos sempre com muita paciência, dedicação e disponibilidade, pelo companheirismo e acima de tudo pela agradável e verdadeira amizade.

Ao professor doutor Antonio Carrilho Neto, quem me iniciou na Estomatologia, agradeço por todos os ensinamentos, amizade, conselhos e carinho.

Ao Fábio, por todo amor, paciência, atenção e dedicação incondicional a mim.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

À professora doutora Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, coordenadora da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Ao professor doutor Alan Roger dos Santos Silva, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pela atenção e disponibilidade.

Aos professores doutores, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Augustin Vargas e Ricardo Della Coletta, das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo exemplo de dedicação à ciência.

Aos profissionais do Laboratório de Patologia Oral e do Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, Fábio Haach Téó, Fabiana Facco Casarotti, Luana Ganhor, Wanderley Francisco Vieira e Floriza Aparecida Godoy, por toda colaboração.

Aos amigos de turma, Juscelino Freitas e Nathalia Lima pelos momentos de estudos, risadas e conversas compartilhados.

Aos amigos Estêvão Azevedo, Harim Tavares, Renato Assis e Rodrigo Neves pela amizade e bons momentos compartilhados.

À Dra. Débora Campanella Bastos, pelos primeiros ensinamentos em cultura de células e técnicas de biologia molecular, obrigada pela paciência e carinho.

À Dra. Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, pelo auxílio, disponibilidade e atenção.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia: Alicia Rumayor, Ana Carolina, Ana Camila, Andréia Bufallino, Camilla Borges, Elizabete Bagordakis, Estêvão de Azevedo, Felipe Paiva, Isadora Luana, José Laurentino, Juscelino Freitas, Karina Moraes, Katya Pulido, Lara Ramos, Lucas Novaes, Luciana Yamamoto, Marcondes Sena, Marisol Martinez, Nathalia Lima, Priscila Campioni, Renato Assis, Rose Ortega, Sabrina Nogueira, Sibebe Aquino, Vinicius Rabelo, Wagner Gomes e Wilfredo Alejandro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que direta ou indiretamente participaram de alguma forma no desenvolvimento desta pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU: 5-Fluorouracil

7-AAD: *7- Aminoactinomycin D*

ACP: *Acyl carrier protein* – Proteína transportadora de acil

AG: Ácidos graxos

CEC: Carcinoma espinocelular

CI: *Combination index* - Índice de combinação

DMEM/F-12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*

DMSO: Dimetil sulfóxido

dUMP: *Deoxyuridine monophosphate* - Monofosfato de deoxiuridina

dUTP: *Deoxyuridine triphosphate* - Trifosfato de deoxiuridina

EGF: *Epidermal growth factor* - Fator de crescimento epidérmico

EGFR: *Epidermal growth factor receptor* – Receptor do fator de crescimento epidérmico

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ErbB: *Epidermal Growth Factor Receptor* - Receptor de fator de crescimento epidérmico

ERK: *Extracellular signal-regulated kinases* - Quinases regulatórias de sinais extra-celulares

FASN: *Fatty acid synthase* – Ácido graxo sintase

FDA: *Food and Drug Administration*

FdUMP: *Fluorodeoxyuridine monophosphate* – Monofosfato de fluorodeoxiuridina

FdUTP: *Fluorodeoxyuridine triphosphate* - Trifosfato de fluorodeoxiuridina

FUTP: *Fluorouridine triphosphate* - Trifosfato de fluorouridina

HIF-1: *Hypoxia-Inducible Factor* - Fator indutor de hipóxia-1

IC₅₀: *Half maximal inhibitory concentration* – Concentração inibitória média

IL: Interleucina

kDa: *Kilodalton* - Quilodaltons

MEK: *Mitogen-activated protein / ERK* - Proteína ERK ativada por mitógeno

NF-κB: *Nuclear factor kappa B* – Fator nuclear kappa B

PBS: *Phosphate Buffered Saline* - Solução salina tamponada com fosfato

PDGF: *Platelet-derived growth factor* - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PerCP: *Peridinin-chlorophyll-protein complex*

PI3K: *Phosphatidylinositol - 3 - kinase* - Fosfatidilinositol - 3 – quinase

RNAi: RNA de interferência

SFB: Soro fetal bovino

SREBP: *Sterol regulatory element binding proteins* - Proteínas ligantes da região regulada por proteínas

TNM: Tumor Nódulo Metástase

TS: Enzima timidilato sintase

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR: *Vascular endothelial growth factor receptor*- Receptor de Fator de crescimento endotelial vascular

Xg: Força centrífuga g

1 INTRODUÇÃO

A ácido graxo sintase (FASN) é a principal enzima envolvida na lipogênese neoplásica, responsável pela síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos precursores malonil-CoA e acetil-CoA (Baron *et al.*, 2004; Flavin *et al.*, 2011). Sua expressão é elevada em vários tipos de neoplasias malignas, tais como câncer de mama (Bershtein *et al.*, 2009), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000), próstata (Rossi *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2006) e carcinoma espinocelular oral (CEC oral) (Silva *et al.*, 2004), sendo apontada como uma oncoproteína metabólica devido a sua habilidade em favorecer o crescimento e sobrevivência das células tumorais. Inibidores da atividade de FASN causam aumento nas taxas de morte celular por apoptose em células de câncer de mama (Lee *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2011), ovário (Uddin *et al.*, 2011), endométrio (Menendez *et al.*, 2004b), estômago (Dowling *et al.*, 2009), próstata (Brusselmans *et al.*, 2003; de Schrijver *et al.*, 2003) e melanoma (Ho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin *et al.*, 2011). Como a expressão elevada de FASN está associada à agressividade tumoral e desenvolvimento de metástases, esta enzima é atualmente considerada um potencial alvo terapêutico para o tratamento oncológico (Menendez & Lupu, 2007; Flavin *et al.*, 2010).

Vários são os compostos capazes de inibir a atividade de FASN, dentre eles a cerulenina, seu análogo sintético c75 e orlistat (Menendez & Lupu, 2007). Outros inibidores, como C93, C247, FAS31, têm sido estudados com a finalidade de reduzir a toxicidade e melhorar a bioviabilidade oral (Flavin *et al.*, 2010; Eberhard *et al.*, 2011). O orlistat (tetrahidrolipstatin, comercializado pela Roche como Xenical[®]) é um derivado semissintético da lipstatina, usado no tratamento da obesidade por inibir de forma irreversível a ação de lipases gástricas e pancreáticas (Guerciolini *et al.*, 1997). Esta droga é também um potente inibidor da atividade de FASN, atuando através da formação de adutos covalentes com o domínio tioesterase, que é o responsável pela liberação do palmitato (Kridel *et al.*, 2004; Flavin *et al.*, 2010).

Os CECs representam aproximadamente 90% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral. Classicamente, a doença ocorre em homens entre a sexta e sétimas décadas de vida, fumantes e etilistas por vários anos, sendo a borda lateral da língua o local de maior incidência (Scully & Bagan, 2009; Warnakulasuriya, 2009; Vargas-Ferreira, 2012). A disseminação metastática dos CECs orais ocorre principalmente através dos vasos linfáticos para os linfonodos cervicais ipsilaterais, sendo que cerca de 2% dos pacientes apresentam metástases à distância no momento do diagnóstico, mais comumente nos pulmões, fígado e ossos (Neville *et al.*, 2009). A localização do tumor e seu estágio de desenvolvimento determinam a melhor estratégia de tratamento, que pode ser cirúrgico, radioterápico, quimioterápico ou combinações destes. Para tumores onde a cirurgia é contraindicada ou na presença de metástases, uma abordagem sistêmica com agentes quimioterápicos é necessária, sendo as principais drogas utilizadas os agentes platínicos (cisplatina e carboplatina), taxanos (paclitaxel e docetaxel) e drogas antimetabólicas (5-FU e metotrexato), de maneira isolada ou combinada (Chabner & Roberts Jr, 2005; Kowalski *et al.*, 2005; Hennequin *et al.*, 2009; revisado por Fury & Pfister, 2011).

Em um estudo recente realizado no laboratório de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP, foram produzidas células SCC-9 capazes de expressar de forma estável a proteína verde fluorescente *ZsGreen* (Agostini *et al.*, 2013). Estas, após injeção nas patas dianteiras de camundongos atímicos, formaram metástases nos linfonodos axilares, que foram utilizados para estabelecer a linhagem celular SCC-9 LN1 (Agostini *et al.*, 2013). As células desta nova linhagem são capazes de formar metástases nos linfonodos cervicais 15 dias apenas após a injeção na língua de camundongos BALB/c *nude*. Utilizando este modelo ortotópico de CEC de língua Agostini *et al.* (2013) observaram que os tumores primários do grupo tratado com orlistat apresentaram volume significativamente menor do que aqueles do grupo controle, com nítida redução do índice de proliferação celular. No entanto, o principal achado deste estudo foi uma redução de 43% no número

de linfonodos positivos no grupo tratado com orlistat, sugerindo que a inibição de FASN pode ser útil no controle da disseminação dos CECs orais.

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo investigar *in vitro* se o bloqueio de FASN com orlistat em associação aos quimioterápicos cisplatina, 5-FU e paclitaxel, empregados na prática clínica para o tratamento do CEC oral em estágios avançados, é capaz de potencializar os efeitos do orlistat isoladamente. Estes estudos irão servir de base para a aplicação destas combinações no modelo ortotópico desenvolvido por nosso grupo e avaliação *in vivo* do potencial clínico da inibição de FASN em CECs orais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A enzima Ácido Graxo Sintase (Fatty acid synthase - FASN)

Muitos tipos de neoplasias malignas apresentam fenótipo lipogênico, pois suas células necessitam de um fornecimento extra de ácidos graxos (AG) para proliferação e sobrevivência (Kuemmerle *et al.*, 2011). Os ácidos graxos são constituintes essenciais das membranas biológicas e importantes substratos para o metabolismo energético. As duas principais fontes de AG para o metabolismo animal são a dieta e a síntese endógena através de FASN. Apesar das células malignas aparentemente darem preferência à segunda, possuem capacidade recentemente demonstrada de obter AG pré-formados derivados da dieta por absorção na corrente sanguínea (Menendez & Lupu, 2007; Kuemmerle *et al.*, 2011).

FASN é a enzima metabólica com papel central na homeostase energética, através da conversão do excesso de carbono em AG para armazenamento. Seu principal produto enzimático, o ácido graxo saturado de 16 carbonos palmitato, é sintetizado a partir da condensação dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA utilizando a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como cofator (Baron *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Migita *et al.*, 2009; Flavin *et al.*, 2010). Estruturalmente (**Figura 1**), FASN é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas multifuncionais, com massa molecular de 250-270 kDa, contendo em cada cadeia sete diferentes sítios catalíticos e um sítio para a proteína transportadora de acil (ACP). Esses sítios em ordem linear a partir da extremidade amino terminal em direção à carboxil terminal são β -cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transferases, β -hidroxiacil desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase, ACP e tioesterase, que atuam em sequência até a liberação da molécula de ácido graxo recém-sintetizada (Wakil, 1989; Jayakumar *et al.*, 1995; Brink *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Flavin *et al.*, 2010).

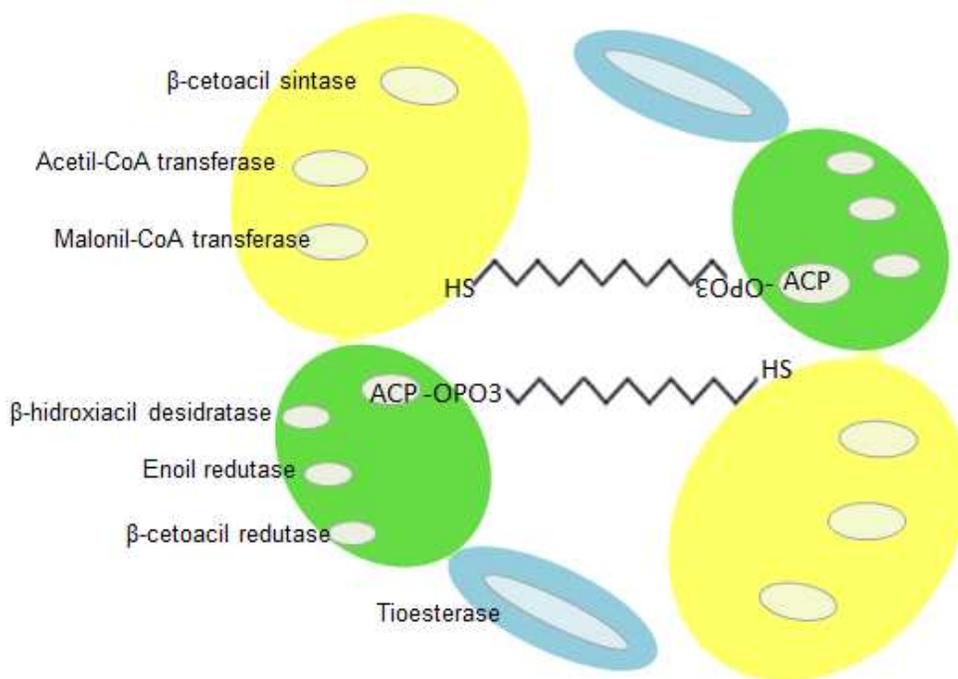


Figura 1: Conformação estrutural da enzima FASN. Homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas multifuncionais contendo sete sítios catalíticos e um sítio para a proteína transportadora de acil (ACP). Estes sítios são, a partir da extremidade amino terminal: β -cetoacil sintase (responsável pela condensação dos resíduos malonil e acetil com a cadeia de ácido graxo em formação), acetil-CoA e malonil-CoA transferases (sítios de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para a subsequente reação de condensação), β -hidroxiacil desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase e ACP (atuam como redutores sobre o produto formado pela β -cetoacil sintase) e o sítio tioesterase (promove a hidrólise do palmitato). Modificado a partir de R.Paselk, 1997.

Em tecidos normais, com exceção do fígado, glândulas mamárias e do tecido adiposo, é baixa a expressão e atividade de FASN. Por outro lado, nas células malignas, que proliferam rapidamente, os ácidos graxos podem ser sintetizados *de novo*, a fim de produzir os lipídios necessários para a formação das membranas, produção de energia através da β -oxidação e para modificações lipídicas das proteínas (Flavin *et al.*, 2010). Dentre as neoplasias malignas que têm elevada expressão de FASN estão os cânceres de mama (Alò *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008; Bershtein *et al.*, 2009), próstata (Shurbaji *et al.*, 1992; Epstein *et al.*, 1995; Shurbaji *et al.*, 1996; Swinnen *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2006), ovário (Alò *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2010), endométrio

(Pizer *et al.*, 1998a; Sebastiani *et al.*, 2004), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001; Orita *et al.*, 2010), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2006), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002, Visca *et al.*, 2004), bexiga (Visca *et al.*, 2003), os carcinomas de células renais (Horiguchi *et al.*, 2008), espinocelular oral (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009), colorretal (Rashid *et al.*, 1997; Ogino *et al.*, 2009), de pâncreas (Witkiewicz *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011) e da tireoide (Vlad *et al.*, 1999), o mieloma múltiplo (Wang *et al.*, 2008), melanomas (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005; de Andrade *et al.*, 2011), além dos sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003) e linfomas não-Hodgkin (Uddin *et al.*, 2010).

Estudos relativamente recentes sugerem um papel oncogênico para FASN. Migita *et al.* (2009) demonstraram que a expressão de FASN em células epiteliais de próstata imortalizadas (PEC) provoca o crescimento e aumenta significativamente a proliferação celular, por inibir a via intrínseca da apoptose, tornando-as tumorigênicas. Menendez *et al.* (2005a) mostraram, em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário, que a inibição de FASN suprime a expressão de ErbB2 e causa elevada regulação de PEA3, um repressor da transcrição de ErbB2. Knowles *et al.* (2004) observaram que, em linhagens celulares de câncer de mama, o bloqueio farmacológico de FASN ou o seu silenciamento através de RNAs de interferência (RNAi) diminuí a proliferação celular, reduz a fosforilação de pRb, aumenta os níveis de p27^{Kip 1} e diminui a quantidade de Skp2. Sendo assim, FASN parece ter uma participação ativa na regulação de proteínas oncogênicas relacionadas com a transformação maligna.

A regulação da expressão de FASN no câncer é complexa e envolve fenômenos como transcrição e controle pós-traducional, sofrendo influências do microambiente tumoral (Flavin *et al.*, 2010). Dois mecanismos principais envolvem a transcrição, a via do fator de crescimento epidérmico (EGF), através dos receptores EGFR e ErbB2, e a via dos hormônios esteroides (estrógeno, progesterona e andrógenos) e seus respectivos receptores (**Figura 2A**) (Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2004c; Zhang *et al.*, 2005; Mashima *et al.*,

2009). Na superfície das células tumorais, os fatores de crescimento e seus receptores levam à ativação da cascata de transdução de sinais da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K-AKT) e das quinases regulatórias de sinais extracelulares (ERK1 e ERK2) e MEK (proteína ERK ativada por mitógeno), as quais modulam a expressão de FASN através da expressão ou maturação nuclear das proteínas SREBP1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*) que se ligam ao promotor de FASN. Os hormônios esteroides ligados a seus respectivos receptores podem desencadear mecanismos semelhantes (Menendez & Lupu, 2007; Flavin *et al.*, 2010). Em estudo recente, Eberhard *et al.* (2011) demonstraram que o silenciamento de SREBP1c, através de RNAi, restaura a sensibilidade de células HeLa, derivadas de câncer de colo de útero, aos mecanismos de apoptose via receptores de morte celular Fas - Fas ligante, possivelmente devido à inibição da expressão de FASN. No entanto, alguns estudos têm mostrado que a expressão de FASN envolve outros fatores de transcrição, tais como a família das proteínas p53 e SPOT14 (proteína nuclear relacionada à lipogênese), a última com altos níveis de expressão em cânceres de mama (D'Erchia *et al.*, 2006; Martel *et al.*, 2006).

Outro mecanismo que regula a produção de FASN, contribuindo para sua alta expressão em células de neoplasias malignas, é o controle pós-traducional (**Figura 2B**). Em estudo sobre câncer de próstata, foi descrito que a desubiquitinase USP2a interage com FASN e remove etiquetas de ubiquitina de moléculas já marcadas para a degradação no proteossomo 26S, protegendo FASN da degradação e aumentando sua meia-vida (Graner *et al.*, 2004). Silva *et al.* (2008) mostraram que em CEC oral a expressão do receptor ErbB2, da enzima FASN e da desubiquitinase USP2a é maior, quando comparada a epitélios normais. Neste mesmo estudo, houve também uma correlação positiva entre a expressão imunoistoquímica de ErbB2, FASN e Ki-67 com a progressão tumoral, maior taxa de recorrência e menor sobrevida dos pacientes. O microambiente tumoral também interfere na expressão de FASN, pois tumores sólidos apresentam privação de nutrientes, hipóxia e baixo pH, o que contribui para a

ativação de várias vias de sinalização que promovem a progressão tumoral e regulam a expressão de FASN (Menendez & Lupu, 2007; Furuta *et al.*, 2008).

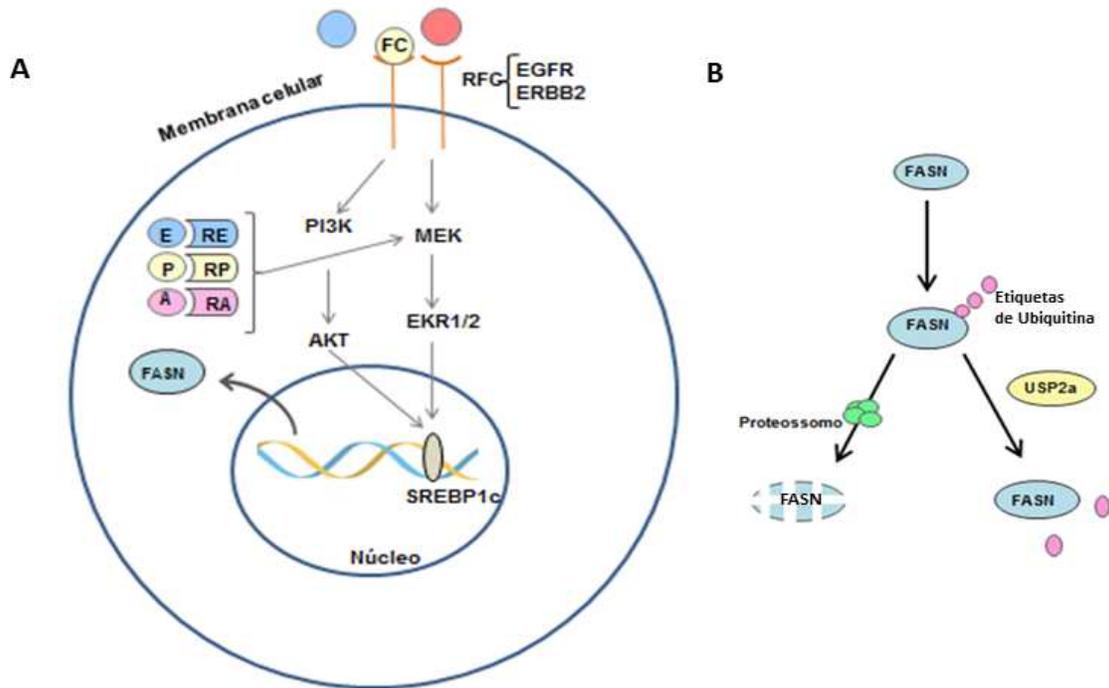


Figura 2: Principais formas de regulação da produção de FASN em neoplasias malignas. (A) Na superfície das células tumorais, fatores de crescimento (FC) e seus receptores, tais como fator de crescimento epidérmico (EGFR) e ErbB2, levam à ativação da cascata de transdução de sinais de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) - AKT e quinases regulatórias de sinais extracelulares (ERK 1 e ERK2) da cascata MEK. Além disso, hormônios esteroides, incluindo estrógeno (E), progesterona (P) e andrógenos (A), ligados aos seus respectivos receptores (R), também podem desencadear mecanismos semelhantes. A expressão ou maturação nuclear de proteínas SREBP1c ativa a expressão de FASN. As ligações entre FC - RFC e entre hormônios esteroides e seus receptores (E-RE, P-RP, A-RA) convergem nas cascatas PI3K - AKT e MEK (proteína ERK ativada por mitógeno) - ERK, amplificando as respostas de expressão de FASN em células neoplásicas. **(B)** A expressão de FASN também pode ser modificada em nível pós-traducional, através da interação com USP2a, isopeptidase que remove etiquetas de ubiquitina de FASN. Modificado a partir de Menendez & Lupu, 2007.

Portanto, alta expressão e atividade de FASN favorecem a proliferação e a sobrevivência das células malignas, o que torna esta enzima um potencial alvo terapêutico para o tratamento oncológico (Menendez & Lupu, 2007).

2.2 Os inibidores de FASN

A inibição da enzima FASN tem sido estudada em diversas linhagens celulares. Devido à alta expressão de FASN em tecidos neoplásicos, seus inibidores farmacológicos parecem atuar preferencialmente sobre as células malignas. De fato, em modelos xenográficos, inibidores de FASN retardam o crescimento tumoral sem danos evidentes às células saudáveis (Menendez & Lupu, 2007; Wang *et al.*, 2008). O bloqueio da lipogênese em células neoplásicas com inibidores de FASN leva a um aumento nas taxas de morte por apoptose, como demonstrado em câncer de mama (Bandyopadhyay *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2011), próstata (Brusselmans *et al.*, 2003; de Schrijver *et al.*, 2003), ovário (Uddin *et al.*, 2011), endométrio (Menendez *et al.*, 2004b), estômago (Dowling *et al.*, 2009), intestino (Murata *et al.*, 2010; Chuang *et al.*, 2011), rim (Horiguchi *et al.*, 2008) e no melanoma (Ho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin *et al.*, 2011).

Dentre os diferentes inibidores da atividade de FASN, a cerulenina, seu análogo sintético c75 e o orlistat, têm sido bastante utilizados, enquanto inibidores sintéticos como C93, C247 e FAS31 têm sido mais recentemente avaliados com a finalidade de suprir deficiências dos primeiros como a toxicidade e bioviabilidade oral (Menendez & Lupu, 2007; Flavin *et al.*, 2010).

A cerulenina ([2R, 3S] -2,3 epoxi-1-oxo-7,10 trans, transdodecadienamida) é um produto natural do fungo *Cephalosporium ceruleans* que inibe a síntese de ácidos graxos bloqueando irreversivelmente a atividade de FASN através de uma ligação covalente no sítio β -cetoacil sintase, o responsável pela reação de condensação de acetil-CoA e malonil-CoA (Pizer *et al.*, 1996; Kuhajda *et al.*, 2000). A aplicação *in vivo* da cerulenina é limitada devido à instabilidade química da sua molécula, causada pela presença de um grupo epóxi extremamente reativo que pode interagir também com outras proteínas (Lupu & Menendez, 2006).

C75 é o derivado sintético da cerulenina que não apresenta o grupo reativo epóxi, é formado por uma cadeia de sete carbonos (α -metileno- γ -butirolactona), com efeitos inibitórios similares aos da cerulenina sobre a atividade de FASN. Entretanto é mais estável e tem melhor efeito *in vivo* (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Todavia, o tratamento com c75 causa rápida perda de peso em animais de laboratório por inibir a expressão do neuropeptídeo Y (NPY), responsável por estimular a ingestão de alimentos através de mecanismos independentes da ação de leptina (hormônio inibidor do NPY) (Loftus *et al.*, 2000; Wortman *et al.*, 2003). Esta inibição ocorre devido à interação do c75 com dois alvos no metabolismo lipídico: FASN e carnitina-palmitoiltransferase 1 (CPT-1) (Lupu & Menendez, 2006).

O orlistat (tetrahidrolipstatin, comercializado pela Roche como Xenical[®]) é um derivado semissintético da lipstatina, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da obesidade por inibir de forma irreversível a ação das lipases gástricas e pancreáticas (Guerciolini *et al.*, 1997). É também um potente inibidor de FASN, atuando através da formação de adutos covalentes com o domínio tioesterase, responsável pela liberação do palmitato (Flavin *et al.*, 2010). Orlistat tem efeito antiproliferativo em células de câncer de mama e próstata e efeito antitumoral em modelo xenográfico de câncer de próstata (Knowles *et al.*, 2004). Menendez *et al.* (2005a, 2005b) observaram que o tratamento de células derivadas de câncer de mama (SK-Br3) e de estômago (NCI-N87) com orlistat causa aumento do índice apoptótico e bloqueio do ciclo celular em G0/G1. Estudo realizado no laboratório de Patologia da FOP-UNICAMP (Carvalho *et al.*, 2008) mostrou que camundongos C57BL/6 com melanomas intraperitoneais provocados pela injeção de células B16-F10 têm redução de cerca de 50% no número de metástases para linfonodos mediastínicos após o tratamento com orlistat. Nas células B16-F10, orlistat causa inibição da proliferação, com bloqueio da passagem para a fase S do ciclo celular (Carvalho *et al.*, 2008). No mesmo grupo de pesquisa, Zecchin *et al.* (2011) mostraram que a inibição de FASN com cerulenina ou orlistat reduz o crescimento e induz apoptose

nas mesmas células B16-F10, o último fenômeno causado pela ativação das caspases -9 e -3 e liberação do citocromo c, independente da ativação de p53 e da transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Nesta mesma linha de pesquisa, Seguin *et al.* (2012) mostraram uma redução de 53,4% nas metástases pulmonares experimentais a partir da inoculação das células de melanoma B16-F10 na cauda de camundongos C57BL/6. Observaram também diminuição dos vasos sanguíneos peritumorais em melanomas experimentais cutâneos de camundongos tratados com orlistat, além de redução da viabilidade, da proliferação e da capacidade de formação de estruturas do tipo capilar *in vitro* por células endoteliais RAEC. Agostini *et al.* (2013) estudaram os efeitos do orlistat em um modelo murino ortotópico de metástase espontânea de CEC de língua, no qual foi observada redução de 43% no número de linfonodos cervicais metastáticos, além de aumento no índice apoptótico das células tumorais e da secreção da isoforma antiangiogênica de VEGFA, o VEGFA_{165b}.

Apesar dos bons resultados do tratamento com orlistat em células de neoplasias malignas, esta droga apresenta limitações farmacológicas como baixa solubilidade e estabilidade metabólica, falta de seletividade e reduzida absorção por via oral (Flavin *et al.*, 2010).

2.3 O carcinoma Espinocelular (CEC) Oral

O CEC oral é um problema grave e crescente em muitas partes do mundo, representando a oitava neoplasia maligna mais comum, com uma estimativa de incidência de 275 mil novos casos por ano (Warnakulasuriya, 2009). Apresenta elevada prevalência, especialmente nas regiões Sul e Sudeste da Ásia (Sri Lanka, Índia, Paquistão e Taiwan), oeste europeu (França) e Europa Oriental (Hungria, Eslováquia e Eslovênia), partes da América Latina e Caribe (Brasil, Uruguai e Porto Rico) e em regiões do Pacífico (Papua Nova Guiné e Melanésia) (Warnakulasuriya, 2009, Scully & Bagan, 2009). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2014, estimam-se 11.280

novos casos de câncer de cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. O CEC oral é considerado um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, pois é diagnosticado geralmente em estágios avançados, o que resulta em altas taxas de mortalidade e morbidade (Parkin *et al.*, 2005; Vargas-Ferreira *et al.*, 2012).

O CEC oral origina-se dos queratinócitos da mucosa bucal e representa aproximadamente 90% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral, sendo os demais, tumores malignos de glândulas salivares, sarcomas, tumores odontogênicos malignos, neoplasias hematopoiéticas ou tumores metastáticos (Epstein *et al.*, 2002; Daley & Darling, 2003; Scully & Bagan, 2009). Classicamente, a lesão acomete principalmente homens entre a sexta e sétimas décadas de vida, fumantes e etilistas por vários anos, ocorrendo principalmente na borda lateral da língua (Sturgis & Cinciripini, 2007; Petti, 2009; Scully & Bagan, 2009; Warnakulasuriya, 2009; Vargas-Ferreira *et al.*, 2012). No entanto, nos últimos anos notou-se um aumento no número de casos de CEC em pacientes jovens, do sexo feminino e com associação limitada aos fatores de risco tradicionais, o que pode indicar novos fatores de risco, como instabilidade genética (Ribeiro *et al.*, 2009; Westra, 2009; Soudry *et al.*, 2010; Santos-Silva *et al.*, 2011).

Como em diversos tipos de cânceres, os CECs orais são oriundos de mutações induzidas por exposição a agentes mutagênicos, oriundos do tabagismo e do álcool, sendo que a combinação destes dois fatores e a relação entre a dose e o tempo de exposição aumenta significativamente o risco para o desenvolvimento do tumor (Hunter *et al.*, 2005; Scully & Petti, 2010, Hoffmannová *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2012). Além disso, indivíduos tabagistas e etilistas apresentam um risco 20 vezes maior para o desenvolvimento de recidivas ou segundos tumores primários na cavidade oral ou no trato aerodigestivo superior, principalmente quando mantêm o hábito após o diagnóstico do tumor primário (Carvalho *et al.*, 2004; Dios & Leston, 2010). O tabaco é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CEC oral, sendo seus carcinógenos (nitrosaminas e benzopirenos) conhecidos por causarem uma transverso em nucleotídeos

guanina em genes envolvidos na carcinogênese oral, como por exemplo, o tp53 (Burns *et al.*, 1993; Brennan *et al.*, 1995; Warnakulasuriya & Ralhan, 2007). Embora o álcool não seja diretamente um agente carcinogênico, este parece atuar como um co-carcinógeno por meio da sua metabolização em acetaldeído, que pode danificar o DNA (Scully *et al.*, 2000; Pöschl & Seitz, 2004). O tabaco e o álcool apresentam ação sinérgica, pois o tabaco aumenta a carga de acetaldeído produzida pelo consumo de álcool e o álcool, por sua vez, aumenta a ativação de pró-carcinógenos presentes no tabaco, favorecendo assim o desenvolvimento do tumor (Scully & Peti, 2010). A exposição crônica aos raios ultravioletas da radiação solar é o principal fator associado aos casos de CEC de lábio, principalmente inferior (Busick *et al.*, 2005). Outros fatores de risco, de natureza controversa, vêm sendo estudados, como a associação do tumor ao papiloma vírus humano (HPV), o baixo nível socioeconômico associado a uma higiene oral precária e ao estado sistêmico do paciente, como desnutrição, anemia ferropriva e deficiência de algumas vitaminas (Pelucchi *et al.*, 2003; Sciubba, 2001; Hermsen *et al.*, 2001; Feller *et al.*, 2010; Hoffmannová *et al.*, 2010; Carnelio *et al.*, 2011).

O CEC oral pode surgir a partir de leucoplasias, eritroplasias ou uma associação de ambas, sendo muitas vezes assintomático. Entretanto, a maioria dos pacientes apresenta-se no momento do diagnóstico, com sinais e sintomas de doença localmente avançada, como dor, dificuldade para falar e deglutir, sangramento, perda de peso, além de linfadenopatia regional (Barnes *et al.*, 2005). A lesão mais frequentemente encontrada ao diagnóstico é uma úlcera, de curso crônico, com bordas elevadas e áreas de necrose central (Pontes *et al.*, 2012). Entre as localizações de maior risco para o desenvolvimento do CEC oral estão as margens póstero-laterais e a base da língua, além do assoalho bucal (Hoffmannová *et al.*, 2010; Dragomir *et al.*, 2012).

Do ponto de vista microscópico, ilhas e cordões invasivos de células escamosas malignas, oriundas do epitélio de superfície, caracterizam o CEC oral. As células apresentam graus variados de pleomorfismo, com núcleos aumentados e hiper cromáticos, eventuais figuras mitóticas atípicas e pérolas de queratina. De

acordo com o grau de diferenciação celular, os CECs orais podem ser classificados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados. A gradação histopatológica de um tumor está relacionada ao seu comportamento biológico (Regezi *et al.*, 2008; Neville *et al.*, 2009).

A disseminação metastática dos CECs orais ocorre principalmente através dos vasos linfáticos para os linfonodos cervicais ipsilaterais, com ocasionais metástases contralaterais ou bilaterais, e pelo menos 2% dos pacientes apresentam metástases à distância ao diagnóstico, mais comumente nos pulmões, fígado e ossos (Neville *et al.*, 2009). A disseminação extracapsular está correlacionada com uma menor sobrevida e conseqüente pior prognóstico para o paciente. Em uma revisão retrospectiva com 250 pacientes com CEC de língua, a taxa de sobrevida global para pacientes com disseminação metastática extracapsular foi de apenas 30% e as metástases à distância foram desenvolvidas em 24,4% dos pacientes com metástase regional e em apenas 3,3% dos pacientes sem envolvimento cervical (Myers *et al.*, 2001).

O prognóstico dos CECs orais e suas abordagens terapêuticas dependem do estadiamento da doença através do sistema TNM (Cotran *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009). Mesmo com suas limitações, o sistema TNM é o principal indicador de prognóstico para os CECs orais. Entretanto, pacientes com o mesmo estágio da doença podem apresentar evoluções clínicas e tempos de sobrevida distintos (Bitu *et al.*, 2012). Outros fatores têm sido investigados como marcadores de prognóstico, como a espessura do tumor (Huang *et al.*, 2009), a classificação histológica (Woolgar *et al.*, 2009), a profundidade de invasão, a propagação extracapsular e a invasão vascular ou perineural (Genden *et al.*, 2010). No entanto, apesar dos inúmeros estudos existentes na literatura, não há até o presente momento, marcadores moleculares que apresentem aplicação clínica na estimativa do prognóstico ou que influenciem as decisões terapêuticas nos casos de CECs orais.

2.4 Tratamento do CEC oral

Os CECs orais apresentam cursos clínicos altamente variáveis, nos quais o atraso no diagnóstico contribui decisivamente para a disseminação tumoral e conseqüente piora no prognóstico do paciente. A taxa de sobrevida global é de aproximadamente 50-60% em cinco anos e está associada ao estágio avançado no momento do diagnóstico, que por sua vez facilita recorrência local e o desenvolvimento de metástases regionais e à distância (Scully & Bagan, 2009; Warnakulasuriya, 2009; Sklenicka *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2011).

A cirurgia é eficaz desde que os tumores não apresentem metástases. De modo geral, a radioterapia é empregada no tratamento de tumores localizados, comumente em conjunto com a cirurgia, o que pode aumentar a eficácia do tratamento. Entretanto, na ocorrência de metástases ou tumores onde a cirurgia é contraindicada, uma abordagem sistêmica com agentes quimioterápicos é necessária (Chabner & Roberts Jr, 2005; Barnes *et al.*, 2005; Hennequin *et al.*, 2009;). Os principais tipos de drogas utilizadas no tratamento quimioterápico dos CECs orais são agentes platinícos (cisplatina e carboplatina), taxanos (paclitaxel e docetaxel) e drogas antimetabólicas (5-fluorouracil e metotrexato), de maneira isolada ou combinada (revisado por Fury & Pfister, 2011). Atualmente, têm sido desenvolvidas terapias-alvo baseadas em agentes que inibem a proliferação de células tumorais, sem afetar as células normais, tais como os anticorpos monoclonais como o cetuximab, que associado ao tratamento padrão de cisplatina com 5-FU aumentou a sobrevida para 10,1 meses e a taxa de controle da doença para 81% (em comparação com 7,4 meses e 60% observado com o tratamento padrão), apresentando ainda melhor controle dos efeitos colaterais (Vermorken *et al.*, 2008).

2.5 Cisplatina

O potencial antitumoral dos compostos de platina foi primeiramente reconhecido após a demonstração da sua capacidade de inibição da divisão bacteriana. Investigações subseqüentes identificaram o composto ativo cisplatina e após uma década de estudos clínicos a droga teve sua aprovação pela FDA no ano de 1978 (Cohen & Lippard, 2001)

A cisplatina (cis-diamminedichloroplatinum (II)) é utilizada no tratamento de diversos tumores sólidos, tais como os carcinomas de mama (Julka *et al.*, 2008; Oksuzoglu *et al.*, 2008), ovário (Saitoh-Sekiguchi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012), pulmão (Binder *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012), bexiga (Herchenhorn *et al.*, 2007; Khaled *et al.*, 2008), testículo (Kondagunta *et al.*, 2005) e cabeça e pescoço (De la Torre *et al.*, 2008; Rampino *et al.*, 2011; Pala *et al.*, 2012). A cisplatina exerce seus efeitos citotóxicos através de reação com o DNA, culminando em parada do ciclo celular e apoptose (Tanida *et al.*, 2012). Após a entrada da cisplatina na célula, os íons cloreto são substituídos por moléculas de água, o que confere carga positiva a cisplatina, que passa a interagir principalmente com o DNA, mas também com o RNA, proteínas, membranas fosfolipídicas e microfilamentos citoesqueléticos (Wang & Lippard, 2005; Rabik & Dolan, 2007). A interação da cisplatina com o DNA ocorre através de ligações covalentes com bases púricas do DNA, levando a formação de adutos intra e intercadeias, os quais inibem a replicação e a transcrição e ativam vias de transdução de sinais que promovem parada do ciclo celular e apoptose (revisado por Kelland, 2007; Tanida *et al.*, 2012). A cisplatina forma uma variedade de adutos no DNA (**Figura 3**), sendo o 1,2-intracadeia o mais comum. Neste aduto, formado entre guaninas adjacentes, o átomo de platina está ligado covalentemente à posição N7 das bases nitrogenadas adjacentes (Zamble & Lippard, 1995, Fuertes *et al.*, 2003).

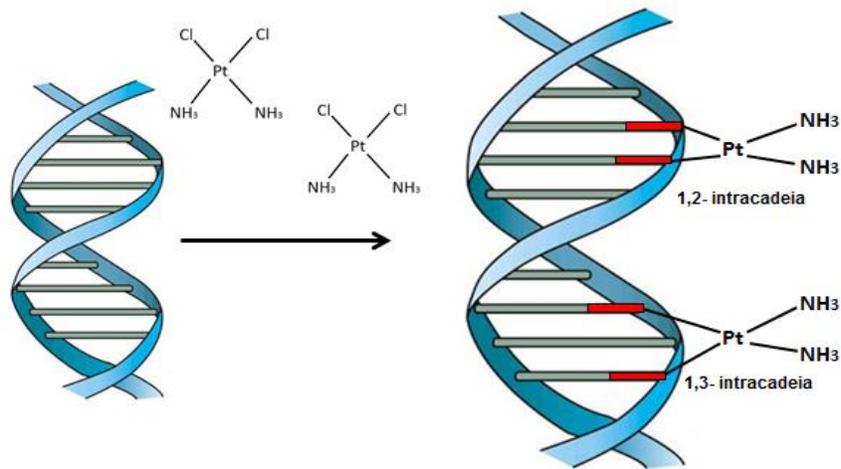


Figura 3: Formação dos adutos de cisplatina no DNA. A cisplatina se liga covalentemente à posição N7 das purinas para formar adutos 1,2 ou 1,3-intracadeias, que causam várias respostas celulares, tais como inibição da replicação, inibição da transcrição, parada do ciclo celular e morte celular por apoptose. Modificado a partir de Wang & Lippard, 2005.

Em estudo realizado por Lee *et al.* (2007), células de CEC oral humanas (TU159, MDA1986 e CAL27) foram tratadas com lupeol, um triterpeno encontrado em frutas, associado a baixas doses de cisplatina o que causou inibição do crescimento celular e apoptose por inibição da atividade de NF-κB. Em modelo murino metastático, os mesmos autores mostraram que a associação de lupeol com baixas doses de cisplatina reduziu significativamente o volume do tumor primário na língua, com evidente aumento no número de células apoptóticas e necróticas nos tecidos tumorais. Além disso, o tratamento também suprimiu a formação de metástases regionais e a invasão local do tumor.

O uso clínico da cisplatina é limitado pelo seu efeito tóxico e pelo desenvolvimento de resistência. O tratamento com cisplatina pode acarretar nefrotoxicidade devido a danos nos túbulos renais proximais, com diminuição da capacidade de filtração e decréscimo do clearance da creatinina. Outros efeitos tóxicos incluem a ototoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, além de náuseas e vômitos intensos (Wang & Lippard, 2005; Yao *et al.*, 2007). Existem vários mecanismos envolvidos na resistência à cisplatina, dentre eles uma menor concentração intracelular causada pela captação reduzida ou acentuado efluxo da

droga, inativação por macromoléculas contendo enxofre, como o antioxidante glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine) e expressão alterada de proteínas que regulam a apoptose e o mecanismo de reparo do DNA (Kartalou & Essigmann, 2001; Sedletska *et al.*, 2005). O reparo do DNA por excisão de nucleotídeos é capaz de remover os adutos de cisplatina, constituindo assim o principal mecanismo de defesa celular contra os efeitos tóxicos da cisplatina e um dos principais fatores que contribuem para a resistência tumoral (Torigoe *et al.*, 2005).

Para minimizar as consequências da resistência ao tratamento com cisplatina, ela é geralmente utilizada como adjuvante na quimioterapia seguida de cirurgia ou radioterapia (Katayama *et al.*, 2012; Nagai *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2012), podendo ser ministrada conjuntamente com outras drogas tais como carboplatina, para o tratamento do câncer cervical (Shen *et al.*, 2011), docetaxel em carcinoma nasofaríngeo (Du *et al.*, 2012), 5-FU em carcinoma de esôfago e adenocarcinoma do trato biliar (Cereda *et al.*, 2010) , esôfago (Emi *et al.*, 2012; Tamura *et al.*, 2012), gemcitabine no tratamento do câncer cervical (Dueñas-González *et al.*, 2012) e paclitaxel em carcinoma de cabeça e pescoço e gástrico (Haddad *et al.*, 2003a; Vermorken *et al.*, 2007; Fujitani *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2012). Nishiyama *et al.* (1999) avaliaram a expressão do gene GST π (glutathione s-transferase), relacionado à resistência à cisplatina, e dos genes DPD (diidropirimidina desidrogenase), MRP (proteína de resistência múltipla a drogas) e TS (timidilato sintase), correlacionados à resistência ao 5-FU, com intuito de determinar a sensibilidade de células de carcinoma gastrointestinal a diferentes concentrações de cisplatina e 5-FU de forma isolada ou conjunta. Neste estudo, comprovou-se que a terapia combinada com baixas concentrações de cisplatina (1 μ g/ml, 30 min) e 5-FU (0,5 μ g/ml, 72 horas) reduziu a expressão dos genes acima mencionados, quando comparados aos tratamentos isolados.

FUTP é incorporado ao RNA e provoca redução da sua estabilidade e conseqüentemente mudanças quantitativas e qualitativas na síntese proteica, com perda funcional e morte celular (Longley *et al.*, 2003). FdUTP é incorporado pelo DNA e provoca danos em sua estrutura, alterando a estabilidade e o reparo e promovendo quebras nas fitas nascentes ou parentais (Longley *et al.*, 2003; Noordhuis *et al.*, 2004) Por sua vez, o metabólito ativo FdUMP é capaz de se ligar a enzima TS e inibir sua atividade. Esta enzima catalisa a conversão de monofosfato de deoxiuridina (dUMP) a trifosfato de deoxiuridina (dUTP), fornecendo timidina para a síntese e reparo do DNA. Suas subunidades possuem dois sítios de ligação, um para o dUMP e outro para a molécula de CH₂THF (5,10-metilenotetrahidrofolato), doador do grupamento metil necessário para a produção da timidina. O composto FdUMP é capaz de se ligar ao primeiro, formando um complexo ternário estável e impedindo a ligação do dUMP (Longley *et al.*, 2003).

Em células de linhagens de CEC oral com expressão de p53 selvagem (OSC-1 e OSC-4) ou mutado (OSC-2 e OSC-3), foi demonstrado que a indução de apoptose mediada por 5-FU ocorre na fase S do ciclo celular e de maneira independente de p21 e p53 (Yoneda *et al.*, 1998). Vazquez-Martin *et al.* (2007) mostraram que a cerulenina aumenta significativamente a eficácia do 5-FU na redução da viabilidade de células de carcinoma de mama (SK-Br3, MCF-7 e MDA-MB-231), mostrando uma ação sinérgica decorrente da inibição prévia, concomitante ou posterior da síntese de AG. Em um estudo realizado por Tamatani *et al.*, (2012), o tratamento de células de CEC oral (B88 e CAL27) com docetaxel promoveu uma redução na expressão gênica e proteica da enzima TS, levando a uma maior eficácia do 5-FU.

Clinicamente, vários efeitos colaterais estão associados ao uso do 5-FU, dentre eles mucosite, mielossupressão, leucopenia, náuseas, diarreia, alopecia, neurotoxicidade e toxicidade ocular e cardíaca (Craig *et al.*, 2005; Katzung, 2007; Savva-Bordalo *et al.*, 2010).

Na procura de uma ação sinérgica, o 5-FU é clinicamente usado em associação com outros quimioterápicos, tais como cisplatina e docetaxel (Haddad

et al., 2003b), irinotecan (Harris *et al.*, 2005), leucovorin (Chong *et al.*, 2006) e oxaliplatina (Giachetti *et al.*, 2000). Os mecanismos de resistência a este quimioterápico estão relacionados à diminuição das enzimas que convertem o 5-FU em seus metabólitos, a inibição incompleta da TS, a diminuição da sua incorporação ao DNA e RNA e ao aumento de diidropirimidina desidrogenase, enzima que cataboliza a droga (Di Paolo *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2007; Matuo, 2008).

2.7 Paclitaxel

O paclitaxel (**Figura 5**) foi descoberto a partir da casca do tronco de *Taxus brevifolia*, como parte de um programa do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, no qual extratos de milhares de plantas foram avaliados com relação à atividade anticâncer (Rowinsky & Donehower 1995). Atualmente, o paclitaxel é obtido através de um método de produção semissintético a partir de 10-desacetilbaccatina III, extraída das folhas do *Taxus baccata* (Yue *et al.*, 2010). Após estudos clínicos de fase I, II e III, a droga foi aprovada pela FDA no final de 1992 com perspectivas de atividade promissora contra câncer de mama, pulmão, esôfago e cabeça e pescoço, por possuir ação sobre os microtúbulos (Rowinsky *et al.*, 1993a; Rowinsky & Donehower 1993, 1995).

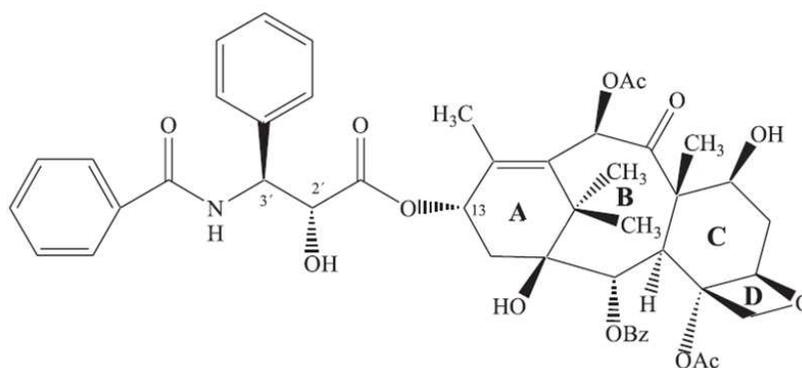


Figura 5: Estrutura química do paclitaxel. O paclitaxel possui 11 centros assimétricos e uma conformação rígida, com ciclos que reforçam a rigidez da estrutura, importante para a estabilização dos microtúbulos. O paclitaxel possui também uma cadeia lateral ligada ao C-13 do sistema terpênico, que é essencial para a atividade biológica. Modificado a partir de Souza, 2004.

Os microtúbulos são componentes essenciais do citoesqueleto celular, formados por longos polímeros proteicos filamentosos, com várias unidades das proteínas heterodiméricas α - e β -tubulina. Eles são cruciais no desenvolvimento e na manutenção da forma da célula, na motilidade, transdução de sinais, transporte intracelular e durante a divisão celular (Jordan & Wilson, 2004). Para exercer seu mecanismo antitumoral, o paclitaxel liga-se ao aminoácido N-31 da subunidade β -tubulina, formando microtúbulos estáveis que comprometem a metáfase e impedem a transição da fase G2 para M, levando a morte celular (Carvalho *et al.*, 2003; Jordan & Wilson, 2004; Yue *et al.*, 2010). O paclitaxel interage também com moléculas regulatórias, pois a alteração na formação dos microtúbulos ativa o gene supressor tumoral p53 e inibidores de quinase dependentes de ciclina (p21^{waf1}), além de modular diversas proteína-quinases (Dumontet & Sikic 1999; Yang *et al.*, 1999; Ferlini *et al.*, 2003)

Woods *et al.*, (1995) avaliaram o tratamento com paclitaxel nas linhagens Hela, Hs578T, Hs578Bst e MCF7 derivadas de câncer de colo de útero, carcinoma de mama, célula normal do tecido mamário e de adenocarcinoma de mama, respectivamente, e observaram dois tipos de parada do ciclo celular: na transição G2/M, a qual provoca rápida apoptose através de uma via independente

de p53, e na fase G1, de maneira lenta e dependente de p53. Li *et al.* (1999) demonstraram que a expressão elevada de p21^{waf1} em células de linhagem de osteossarcoma humano (SaOs-2) com ausência de p53 e PRb provoca resistência ao tratamento com paclitaxel, pois há redução no acúmulo de células na fase G2/M e nas taxas de apoptose. Portanto, a expressão de p21^{waf1} pode determinar a sensibilidade de células neoplásicas ao paclitaxel.

Em ensaios clínicos de fase I, II e III a terapia com paclitaxel tem mostrado eficácia no tratamento de diversas neoplasias quando em combinação com outras drogas, tais como a carboplatina e TSU-68 (Okamoto *et al.*, 2012), S-1 e cisplatina (Iwase *et al.*, 2011), cisplatina, 5-FU e leucovirin (Jung *et al.*, 2009), gemcitabine (Moinpour *et al.*, 2012), panitumumab e carboplatina (Wirth *et al.*, 2010), pemetrexed (Stathopoulos *et al.*, 2007), dentre outras. Seu uso clínico é limitado principalmente pela resistência à droga e toxicidade. A resistência aos taxanos é multifatorial e pode envolver a elevada expressão da glicoproteína P (P-gp), proteína capaz de transportar a droga para o exterior da célula, diminuindo sua concentração intracelular a níveis subletais. Mutações na tubulina, aumento na dinâmica dos microtúbulos associado à alteração na expressão das proteínas associadas ao microtúbulos (MAPs), além de expressão anormal da isoforma β -tubulina de classe III podem alterar os efeitos do paclitaxel. Os efeitos colaterais da droga incluem neutropenia, mucosite, neuropatia e reações de hipersensibilidade (Yue *et al.*, 2010).

2.8 Combinação de drogas na quimioterapia de CECs de cabeça e pescoço

A indicação da terapia sistêmica deve levar em consideração as condições gerais do paciente, como estado nutricional, funções hepática, renal e pulmonar, presença de outras co-morbidade e infecções, o grau histológico do tumor, bem como disseminação metastática. Algumas contraindicações para a quimioterapia são também citadas, como pacientes em estado terminal, perda de mais de 10% do peso corporal desde o início da doença, septicemia, coma,

mulheres no primeiro trimestre da gestação e indivíduos com idade inferior a três meses ou com idade muito avançada (INCA).

Em geral, os tratamentos quimioterápicos empregam combinações de medicamentos com diferentes mecanismos de ação, com o objetivo de atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular e utilizar a ação sinérgica para diminuir o desenvolvimento de resistência e obter respostas mais eficazes do que as observadas com a monoterapia (Matuo, 2012). Os protocolos consistem na associação de dois ou mais quimioterápicos, como por exemplo, o paclitaxel associado à cisplatina para o tratamento do carcinoma de cabeça e pescoço recorrente ou metastático (Adamo *et al.*, 2004), docetaxel, cisplatina e 5-FU para câncer de esôfago (Emi *et al.*, 2012), dentre muitos outros. No entanto, o tratamento com mais de um agente quimioterápico não possui benefício se as drogas utilizadas apresentarem efeitos antagônicos, sendo por isso necessária a existência de sinergismo (Kogashiwa & Kohno, 2013). A **tabela 1** mostra os resultados de alguns grandes ensaios clínicos randomizados realizados utilizando diferentes regimes quimioterápicos em pacientes portadores de CECs de cabeça e pescoço.

Tabela 1: Resultados de ensaios clínicos randomizados utilizando diferentes regimes quimioterápicos no tratamento de CECs cabeça e pescoço em estádios avançados.

Autor	Número de pacientes	Regime quimioterápico	Resposta ao tratamento (%)	Sobrevida (meses)
Jacobs <i>et al.</i> 1992	249	CF	32	5,5
		C	17	5
		F	13	6,1
Forastiere <i>et al.</i> 1992	277	CF	32	6,6
		CbF	21	5
		M	19	5,6
Clavel <i>et al.</i> 1994	382	CMBV	34	7
		CF	31	7
		C	15	7
Gibson <i>et al.</i> 2005	218	CF	27	8,7
		CT	26	8,1
Vermorcken <i>et al.</i> 2007	358	CFT	33,30	18,8
		CF	19,90	14,5
Herman <i>et al.</i> 2013	143	CFT	completa: 14,4 parcial: 68,9	73,2 % em 1 ano
		CbT	completa: 9,4 parcial: 75,5%	60,7% em 1 ano

C: cisplatina, F: 5-fluorouracil, Cb: carboplatina, M: metotrexato, B: bleomicina, V: vincristina, T: taxol (docetaxel, paclitaxel).

A combinação cisplatina com 5-FU foi primeiramente testada em 1980 e se tornou o tratamento padrão para pacientes com CECs de cabeça e pescoço recorrente ou metastático, proporcionando uma sobrevida média de nove meses, porém, acompanhada de neutropenia, trombopenia, anemia, infecções, náusea, vômitos e mucosites (revisado por Molin & Fayette, 2011). Em ensaio clínico de

fase III com 249 pacientes Jacobs *et al.* (1992) compararam o uso dos quimioterápicos cisplatina e 5-FU isolados e combinados em pacientes com CECs de cabeça e pescoço em estágio avançado. As taxas de resposta ao tratamento foram de 17% para o grupo que recebeu cisplatina, 13% para o tratamento com 5-FU e 32% para a combinação, porém esta melhor resposta não refletiu em aumento na sobrevida dos pacientes que foi em média 5,7 meses para os três grupos. Quarenta por cento dos pacientes que receberam a terapia combinada sobreviveram mais de 9 meses, em comparação com 24 e 27% dos que receberam cisplatina e 5-FU, respectivamente. Brizel *et al.* (1998) associaram a radioterapia hiperfracionada aos quimioterápicos cisplatina e 5-FU em um estudo com 116 pacientes acompanhados por 3 anos. Neste estudo, a taxa de sobrevida global foi de 55% no grupo com terapia combinada e 34% no grupo que recebeu radioterapia, a taxa de sobrevida livre de recidiva foi de 61% no grupo de terapia combinada versus 41% no grupo que recebeu radioterapia, e a taxa de controle loco-regional da doença em 3 anos foi de 70% na terapia combinada e 44% na radioterapia. Recentemente, Ma *et al.* (2012) realizaram uma meta-análise de estudos randomizados controlados realizados durante os anos de 1965 a 2011 com o intuito de investigar o impacto da quimioterapia sobre a sobrevida, controle loco-regional da doença, metástases a distância e a toxicidade em pacientes com CEC avançado. O protocolo quimioterápico mais utilizado foi o cisplatina com 5-FU, capaz de melhorar taxas de sobrevida em 13% e reduzir a taxa de metástases a distância em 5 anos em 11%, quando comparados aos pacientes que receberam apenas o tratamento cirúrgico. Não foram observados benefícios no controle loco-regional da doença.

Adamo *et al.* (2004) estudaram o efeito da combinação de cisplatina e paclitaxel em CECs recorrentes e metastáticos e encontraram resposta global ao tratamento de 41%, e média de sobrevida global de 11 meses. Estes autores concluíram que a terapia associada de cisplatina com paclitaxel produz respostas semelhantes ao regime padrão de cisplatina com 5-FU, porém, com melhor tolerância e menor toxicidade. A terapia combinada entre cisplatina e paclitaxel

também foi avaliada por Murphy *et al.* (2001) em estudos clínicos na fase II, e também não foi capaz de aumentar a eficácia do tratamento padrão, contudo houve redução da toxicidade, principalmente com relação à mucosite.

Vermorken *et al.* (2007) associaram o paclitaxel à terapia padrão de cisplatina com 5-FU em pacientes portadores de CECs irressecáveis, no estágio III ou IV, melhorando significativamente o risco de progressão e a sobrevida global. Os pacientes apresentaram uma redução de 28% no risco de progressão da doença, uma melhora da sobrevida global de 4,3 meses e um aumento em três anos de vida de 10,9% em comparação com o regime quimioterápico padrão. Herman *et al.* (2013) compararam a eficácia do tratamento em pacientes com CEC em estágio III e IV com as combinações carboplatina e paclitaxel (CP) ou docetaxel, cisplatina e 5-FU (DCF). O controle loco-regional da doença em um ano foi de 80,5% para os pacientes tratados com CP e de 55,55% para DCF, a sobrevida livre de progressão da doença em um ano foi de 73,2% para CP e 60,7% para DCF. Neste estudo, a quimioterapia tripla foi associada a uma maior toxicidade renal com aumento nos níveis de creatinina durante a quimioterapia de indução. No entanto, estudos anteriores demonstraram que esta terapia tripla tem a eficácia semelhante à terapia padrão com cisplatina e 5-FU (Benasso *et al.*, 2006; Worden *et al.*, 2006).

Apesar dos avanços nas terapias sistêmicas, a média de sobrevida dos pacientes com CECs de cabeça e pescoço recorrentes ou metastáticos permanece menor do que um ano (revisado por Price & Cohen, 2012). A investigação de novos agentes e/ou regimes quimioterápicos é ainda necessária. Avanços na pesquisa básica pedem identificação de novos alvos terapêuticos e a aplicação do perfil genômico e proteômico fornecerão dados para uma futura individualização do tratamento.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da combinação do inibidor de FASN orlistat com os quimioterápicos cisplatina, 5-FU e paclitaxel em linhagem celular metastática derivada carcinoma espinocelular oral humano (SCC-9 LN1).

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Identificar a concentração de orlistat, cisplatina, 5-FU e paclitaxel necessária para inibição do crescimento celular em 50% (IC₅₀).

3.2.2 Analisar os índices de sinergismo, antagonismo ou adição decorrentes das diferentes combinações destas drogas.

3.2.3 Avaliar os índices de apoptose e a progressão do ciclo celular em células tratadas com orlistat combinado a estes quimioterápicos.

3.2.4 Avaliar os efeitos das combinações descritas acima sobre a expressão de VEGFA e VEGFA_{165b}.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

A linhagem celular metastática de CEC oral humano - SCC-9 LN1, estabelecida no laboratório de Patologia Bucal da FOP/UNICAMP a partir da linhagem SCC-9 (ATCC, E.U.A.), foi cultivada em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (Corning, E.U.A.) em meio de cultura DMEM/F-12 (Invitrogen, E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, 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 CO₂ e 95% de umidade.

As células utilizadas nos experimentos foram subcultivadas e, ao atingirem uma confluência de aproximadamente 70%, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e incubadas com 500 µl ou 2 ml de tripsina, para frascos de 25 cm² ou 75 cm² respectivamente, a 37°C. Após o desprendimento das células do assoalho do frasco por aproximadamente cinco minutos, a ação da tripsina foi inativada pela adição de 5 ml (frasco de 25 cm²) ou 10 ml (frasco de 75 cm²) de meio de cultura DMEM/F-12 com 10% SFB. A suspensão de células foi transferida para tubos plásticos cônicos de 15 ml estéreis (Corning, E.U.A.) e estes centrifugados a 800 xg durante três minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* de células ressuspensionado em 5 ml de meio de cultura DMEM/F-12 com 10% de SFB. As células foram contadas em hemocitômetro e plaqueadas em novos frascos de cultura para montagem dos experimentos. Visando manter o estoque congelado em nitrogênio líquido e trabalhar sempre com células em passagens semelhantes, várias amostras desta linhagem celular foram congeladas antes da realização dos experimentos. Para isto, as células foram ressuspensas em solução contendo 20% de di-metil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, E.U.A.) e 80% de SFB e congeladas em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os criotubos

(Corning, E.U.A.) foram colocados em banho de água a 37°C e, após rápido descongelamento, as células foram transferidas para tubos de 15 ml contendo 10 ml de meio suplementado e centrifugadas. Os *pellets* foram então ressuspensos em 10 ml de meio de cultura e as células plaqueadas para realização dos experimentos. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram tomados todos os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as células SCC-9 LN1 subcultivadas por no máximo dez passagens e descartadas.

4.2 Preparo das soluções de Orlistat

O composto ativo do Orlistat (Xenical[®], Roche, Suíça) foi extraído de acordo com Knowles *et al.* (2004), dissolvendo-se o conteúdo de uma cápsula em 1 ml de etanol absoluto (Merck, Alemanha), seguido de agitação a cada 10 minutos, por um período de 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a solução foi centrifugada a 16.000 xg por cinco minutos a 4°C e o sobrenadante coletado. Foram feitas alíquotas e estas mantidas a -80°C até o momento de uso.

4.3 Preparo dos quimioterápicos

Os quimioterápicos paclitaxel (Ontax[®], 150 mg), cisplatina (Fauldcispla[®], 100 mg) e 5-FU (Fauldfluor[®], 2,5 g) foram gentilmente doados pela empresa farmacêutica LIBBS (Brasil). As soluções originais das drogas foram diluídas em PBS antes da adição às culturas celulares, o 5-FU foi diluído de uma concentração de estoque de 50 mg/ml para 0,5 mg/ml e o paclitaxel de uma concentração inicial de 6 mg/ml para $8,5 \times 10^{-6}$, a cisplatina não necessitou de diluição. Para os controles, foi usado etanol absoluto, visto que o orlistat é diluído em etanol, e PBS para os quimioterápicos.

4.4 Ensaio colorimétrico com cristal violeta

O corante cristal violeta (Sigma-Aldrich, HT90-1, E.U.A.) foi utilizado na quantificação do número de células para avaliar os efeitos dos tratamentos devido a sua habilidade de ligação ao DNA. Para estes experimentos, foram plaqueadas 5×10^4 células por poço em placas de 24 poços. Após 24 horas o meio foi trocado por meio contendo os controles e concentrações exponenciais de orlistat, cisplatina, 5-FU e paclitaxel. Passadas 48 horas de tratamento, o meio foi removido e os poços lavados com PBS e fixados em paraformaldeído a 4% por 15 minutos. Após esse período, adicionou-se 500 μ l da solução de cristal violeta (50 mg de cristal violeta em pó, 5 ml de etanol absoluto e 45 ml de água destilada) e, após incubação por 20 minutos, os poços foram lavados três vezes com água destilada e incubados com ácido acético a 10% por 20 minutos. As amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:4 e as absorbâncias mensuradas no espectrofotômetro Spectronic Genesys 2, ajustado para 590 nm.

4.5 Cálculo do IC₅₀ e análise do índice de combinação (CI)

O valor do IC₅₀ (metade da concentração máxima inibitória) indica a concentração de um fármaco necessária para inibir a função biológica ou bioquímica pela metade *in vitro*. O efeito da combinação de diferentes drogas, principalmente as antineoplásicas, pode ser estimado pelo índice de combinação (CI) (Chou e Talalay, 1984). Por este método, temos: CI < 1 (efeito sinérgico), CI = 1 (efeito aditivo) e CI > 1 (efeito antagônico). Sinergismo é definido como uma potencialização do efeito da droga, onde o efeito resultante é maior do que os efeitos individuais. Antagonismo é o efeito oposto, no qual o efeito individual é maior do que os efeitos em combinação e efeito aditivo é aquele no qual o efeito combinatório é igual aos efeitos individuais. Para os cálculos do IC₅₀ e do índice de combinação (CI) das drogas estudadas utilizou-se o *software* CompuSyn (E.U.A.) desenvolvido por Chou & Martin (2005).

4.6 Avaliação das taxas de morte celular por apoptose e necrose

A detecção de células em apoptose foi realizada pela marcação com Anexina V-PE (BD Pharmingen™, E.U.A.), sendo as células em necrose identificadas com 7AA-D –PerCP (BD Pharmingen™, E.U.A.). Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células SCC-9 LN1 em 5 ml de meio DMEM/F-12 com 10% de SFB em frascos de 25 cm². Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por meio fresco suplementado com 10% de SFB contendo orlistat, cisplatina, 5-FU, paclitaxel e orlistat associado à cisplatina, ao 5-FU e ao paclitaxel, todos nas concentrações de seus respectivos IC₅₀, além dos devidos controles. Após 24, 36 e 48 horas, o meio foi coletado, as células lavadas com 5 ml de PBS (também coletado e transferido para um tubo plástico de 15 ml) e adicionados 500 µl de solução de tripsina. A tripsina foi inativada com meio de cultura, o qual foi centrifugado a 800 xg por três minutos, juntamente com o PBS anteriormente coletado. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 100 µl de tampão de ligação contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂ e incubados com 0,1 µg/µl de Anexina V-PE e 0,1 µg/µl de 7AA-D–PerCP por 20 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após a incubação, as suspensões celulares foram centrifugadas a 800 xg por três minutos a 4°C, os sobrenadantes descartados e os *pellets* ressuspensos em 500 µl de tampão de ligação. Após nova centrifugação e descarte dos sobrenadantes, os *pellets* foram ressuspensos em 200 µl de paraformaldeído a 0,1%. A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) em canal FL1 e FL2 e as análises realizadas com o auxílio do programa CellQuest (Becton Dickinson). Foram analisados 10.000 eventos para cada condição experimental.

4.7 Análise do ciclo celular

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada após marcação do conteúdo total de DNA com iodeto de propídeo. Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células em 5 ml de meio de cultura suplementado com 10% de SFB em frascos de 25 cm². Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por meio fresco sem SFB, a fim de se promover a sincronização das células na fase G1 do ciclo celular. Passadas mais 24 horas, o meio de cultura foi trocado por meio fresco suplementado com 10% de SFB contendo as drogas estudadas e suas respectivas associações, como descrito em 4.6. Após os períodos de 24, 36 e 48 horas, as células foram lavadas com 5 ml de PBS, tripsinizadas, ressuspendidas em etanol 70% gelado e mantidas por 12 horas a -20°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS gelado e tratadas com 10 µg/ml de RNase (Sigma) a 37°C por 1 hora. Após coloração com 50 µg/ml de iodeto de propídeo a 4°C no escuro por 2 horas, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) no canal FL2. As porcentagens de células em cada fase do ciclo celular foram obtidas através do programa ModFit LT™ (Verity Software House, E.U.A.).

4.8 Estudo da secreção de VEGFA e VEGFA_{165b} através de ELISA

A concentração das proteínas VEGFA e VEGF_{165b} nos meios de cultura condicionados por células tratadas com as drogas estudadas foi avaliada por ELISA. Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células em 5 ml de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% SFB em frascos de 25 cm². Após 24 horas, os meios foram removidos, as células lavadas duas vezes com PBS e então acrescentados 2 ml de novos meios de cultura suplementados com 2% de SFB contendo as drogas e associações estudadas. Passadas 48 horas de tratamento, os meios foram coletados, centrifugados para a remoção de debris e mantidos a -80°C até o momento da análise. A concentração das proteínas VEGFA (Human VEGFA

DuoSet ELISA, R & D Systems) e VEGF_{165b} (Human VEGF_{165b} DuoSet ELISA, R & D Systems) foi determinada conforme as instruções do fabricante. Para a normalização dos resultados foi utilizada a concentração total de proteínas nos meios de cultura.

4.9 Análise estatística

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc. E.UA.). Foi utilizado o teste *t* de Student pareado, sendo considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos citotóxicos e/ou de inibição do crescimento celular das drogas orlistat, cisplatina, 5-FU e paclitaxel nas células SCC-9 LN1. Determinação da IC₅₀

Os efeitos citotóxicos e/ou de inibição da proliferação celular das drogas orlistat, cisplatina, 5-FU e paclitaxel foram avaliados nas células SCC-9 LN1 após 48 horas de tratamento, através de ensaios colorimétricos com cristal violeta. A técnica do MTT, que avalia a atividade mitocondrial e é bastante utilizada na literatura para esta mesma finalidade, foi por nós descartada após muitas tentativas de padronização, pois não obtivemos resultados dose-dependentes (**Figura 6**). O tempo de 48 horas foi estabelecido com base nos estudos prévios realizados em nosso laboratório (Agostini *et al.*, 2013) e também devido ao fato de que os quimioterápicos 5-FU e paclitaxel atuam preferencialmente nas fases G1/S e G2/M do ciclo celular, respectivamente (Li *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2001)

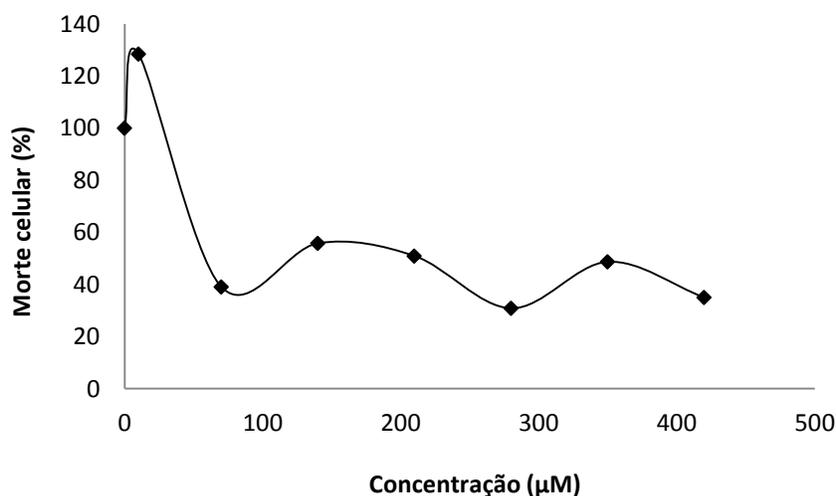


Figura 6: Efeitos do orlistat sobre a inibição do crescimento e/ou morte celular na linhagem celular SCC-9 LN1 após 48 horas de tratamento. As células foram expostas a concentrações crescentes da droga (10, 70, 140, 210, 280, 350 e 420 µM) e avaliadas pela técnica do MTT. Não foi observada relação de dose/dependência como obtido com a técnica do cristal violeta (figura 7).

Os valores obtidos a partir das análises colorimétricas dos efeitos das diversas concentrações de cada droga sobre as células SCC-9 LN1 foram analisados com o auxílio do *software* CompuSyn, especificamente desenhado para o estudo de interações entre diferentes drogas (Chou, 2010). As concentrações aqui utilizadas de cada quimioterápico para a determinação da IC₅₀ foram escolhidas a partir de extensiva revisão das publicações existentes na literatura utilizando linhagens de células malignas ou modelos experimentais de câncer em camundongos (Ricotti *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Zoli *et al.*, 2005; Adriani *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2008; Schuler *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2011; Law *et al.*, 2007). As concentrações de orlistat foram baseadas nos estudos prévios de nosso laboratório (Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin *et al.*, 2011; Seguin *et al.*, 2012; Agostini *et al.*, 2013). Assim, as dosagens que causam 50% de inibição do crescimento e/ou morte celular (IC₅₀) estabelecidas foram de 80 µM para o orlistat (**Figura 7**), 7 µM para a cisplatina (**Figura 8**), 11 µM para o 5-FU (**Figura 9**) e 0,01 µM para o paclitaxel (**Figura 10**).

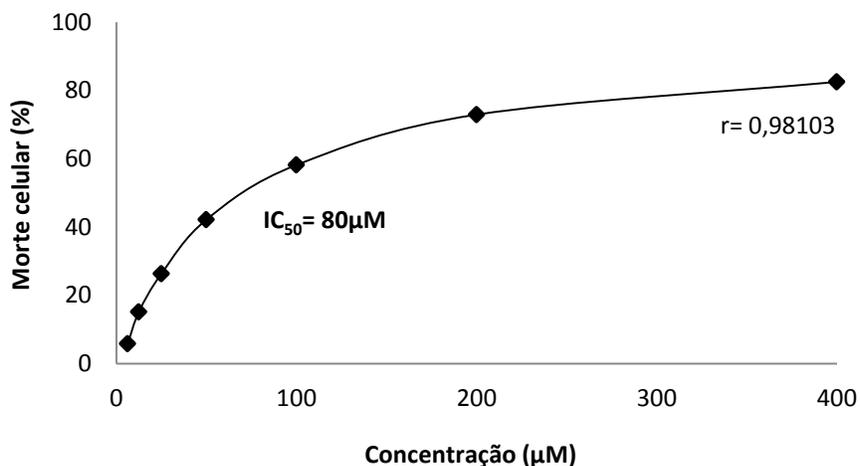


Figura 7: Efeitos do orlistat sobre a inibição do crescimento e/ou morte das células SCC-9 LN1 após 48 horas de tratamento. As células foram expostas a concentrações crescentes do medicamento (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µM). A dose correspondente ao IC₅₀, determinada pelo *software* CompuSyn, foi a de 80 µM.

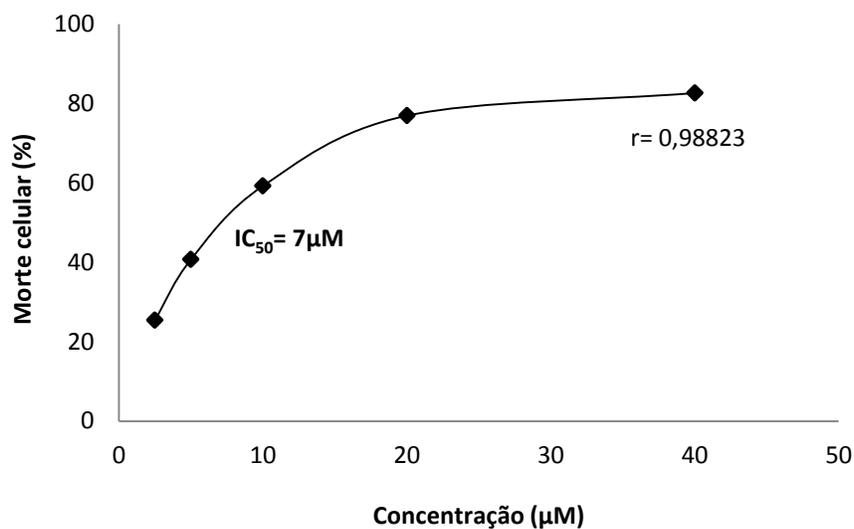


Figura 8: Efeitos da cisplatina sobre a inibição do crescimento e/ou morte das células SCC-9 LN1 após 48 horas de tratamento. As células foram expostas a concentrações crescentes do quimioterápico (2,5; 5; 10; 20 e 40 µM). As análises de dose/efeito realizadas com o auxílio do *software* CompuSyn mostraram que a IC_{50} foi 7 µM.

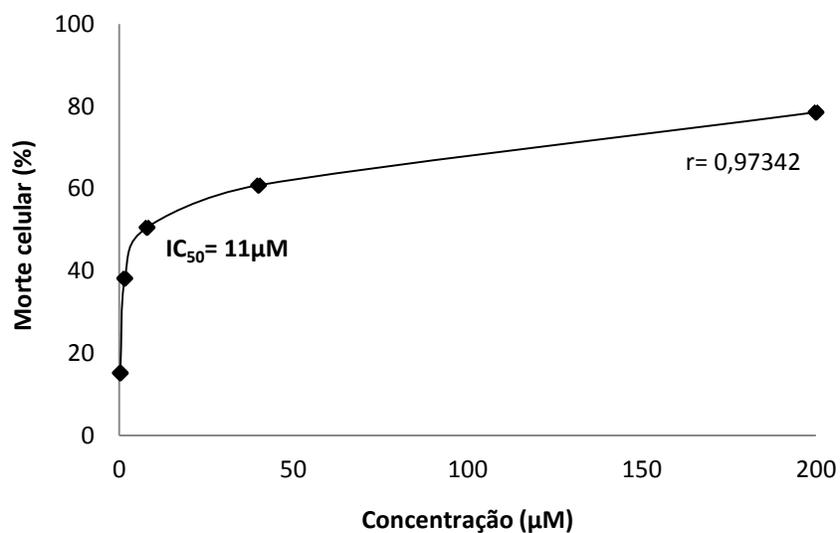


Figura 9: Efeitos do 5-FU sobre a inibição do crescimento e/ou morte na linhagem celular SCC-9 LN1, após 48 horas de tratamento. As concentrações do medicamento utilizadas neste experimento foram: 0,32; 1,6; 8; 40 e 200 µM. O estudo da curva dose/efeito evidenciou que a IC_{50} foi 11 µM.

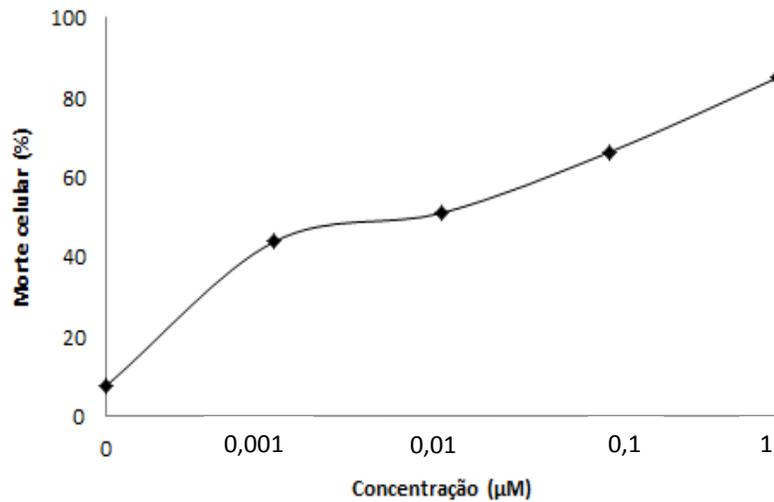


Figura 10: Efeitos do paclitaxel sobre a inibição do crescimento e/ou morte das células SCC-9 LN1 após 48 horas de incubação. As células foram expostas a concentrações crescentes do medicamento (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 μM) e a IC_{50} obtida foi 0,01 μM.

5.2 Análise dos índices de sinergismo, antagonismo e de adição das combinações de orlistat com os quimioterápicos

As concentrações utilizadas para a realização dos experimentos combinando orlistat com cisplatina, 5-FU ou paclitaxel foram estabelecidas após a determinação das IC_{50} de cada droga individualmente. Os índices de combinação (CI) foram obtidos após o tratamento das células SCC-9 LN1 por um período também de 48 horas com concentrações exponenciais de cada droga isoladamente e em diferentes combinações (**Tabelas 1 a 4**).

Tabela 1: Concentrações utilizadas para se estabelecer o índice de combinação (CI) entre orlistat e cisplatina.

Droga	Orlistat	Cisplatina	Combinação
Concentração (μM)	20	1,75	20 + 1,75
	40	3,5	40 + 3,5
	80	7	80 + 7
	160	14	160 + 14
	320	28	320 + 28

Tabela 2: Concentrações utilizadas para o cálculo do índice de combinação (CI) entre orlistat e 5-FU.

Droga	Orlistat	5-FU	Combinação
Concentração (μM)	20	2,75	20 + 2,75
	40	5,5	40 + 5,5
	80	11	80 + 11
	160	22	160 + 22
	320	44	320 + 44

Tabela 3: Concentrações utilizadas para o estabelecimento do índice de combinação (CI) entre orlistat, cisplatina e 5-FU.

Droga	Orlistat	Cisplatina	5-FU	Combinação
Concentração (μM)	20	1,75	2,75	20 + 1,75 + 2,75
	40	3,5	5,5	40 + 3,5 + 5,5
	80	7	11	80 + 7 + 11
	160	14	22	160 + 14 + 22
	320	28	44	320 + 28 + 44

Tabela 4: Concentrações usadas para se determinar o índice de combinação (CI) entre orlistat e paclitaxel

Droga	Orlistat	Paclitaxel	Combinação
Concentração (μM)	20	0,25	20 + 0,25
	40	0,50	40 + 0,5
	80	1	80 + 1
	160	2	160 + 2
	320	4	320 + 4

Os resultados dos ensaios colorimétricos realizados nas células SCC-9 LN1 tratadas com as combinações descritas nas Tabelas 1 a 4 foram inseridos no *software* CompuSyn para avaliação do tipo de efeito obtido. Foi possível observar sinergismo entre as combinações de orlistat com 5-FU (CI = 0,63) e orlistat com paclitaxel (CI = 0,36). Vale a pena ressaltar aqui que o sinergismo ocorre quando os valores são menores do que 1 e que quanto menor o valor obtido maior o efeito sinérgico. Efeito aditivo foi observado na combinação de orlistat com cisplatina, na qual o CI foi igual a 1. Por outro lado, quando combinados orlistat, cisplatina e 5-FU, o efeito resultante foi de antagonismo, com CI de 1,54 (**Figura 11**).

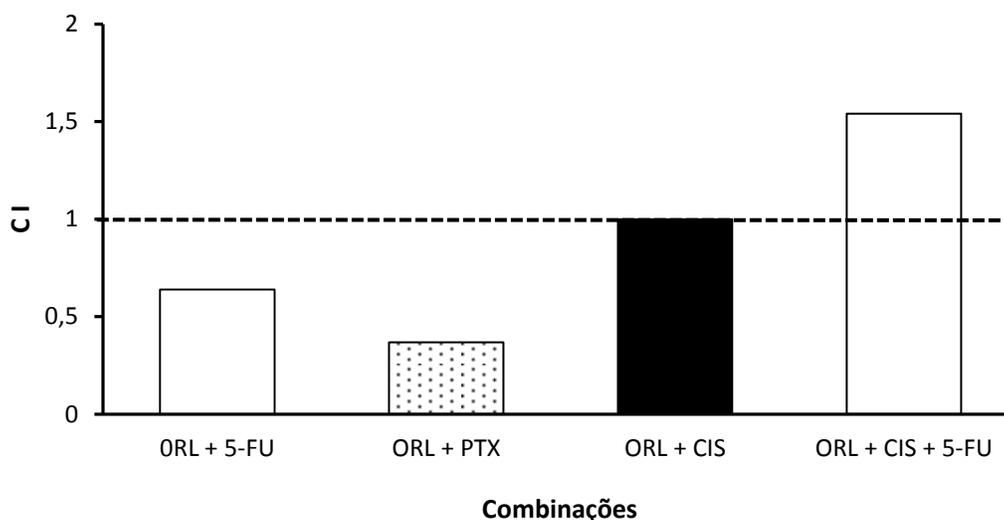


Figura 11: Índices de combinação (CI) obtidos após o tratamento das células SCC-9 LN1 com as combinações estudadas de orlistat com os quimioterápicos cisplatina, 5-FU e paclitaxel. As análises realizadas com o auxílio do *software* CompuSyn, a partir dos ensaios colorimétricos feitos com cristal violeta, evidenciaram efeito sinérgico nas combinações de orlistat com 5-FU (CI < 1) e orlistat com paclitaxel (CI < 1). Efeito aditivo foi observado na combinação de orlistat com cisplatina (CI = 1) e efeito antagonístico na combinação tripla de orlistat, cisplatina e 5-FU (CI >1).

5.3 Efeitos do orlistat, em associação com cisplatina, 5-FU ou paclitaxel na indução de morte celular

Para avaliação das taxas de apoptose e de necrose nas células SCC-9 LN1 tratadas com orlistat e os quimioterápicos aqui estudados, isolados ou em combinação, foram realizados três experimentos independentes com as drogas em seus respectivos IC₅₀, nos períodos de 24, 36 e 48 horas. Após 24 horas de tratamento observou-se um maior índice de apoptose nas células tratadas simultaneamente com orlistat e paclitaxel (**Figura 12**). As demais combinações estudadas não se mostraram efetivas, sendo que a combinação de orlistat com 5-FU ou cisplatina foram menos efetivas do que as drogas isoladas (**Figura 12**). As taxas de morte celular por necrose foram muito baixas e, aparentemente, não afetadas pelos tratamentos em nenhum dos períodos de tempo estudados (**Figuras 12, 13 e 14**).

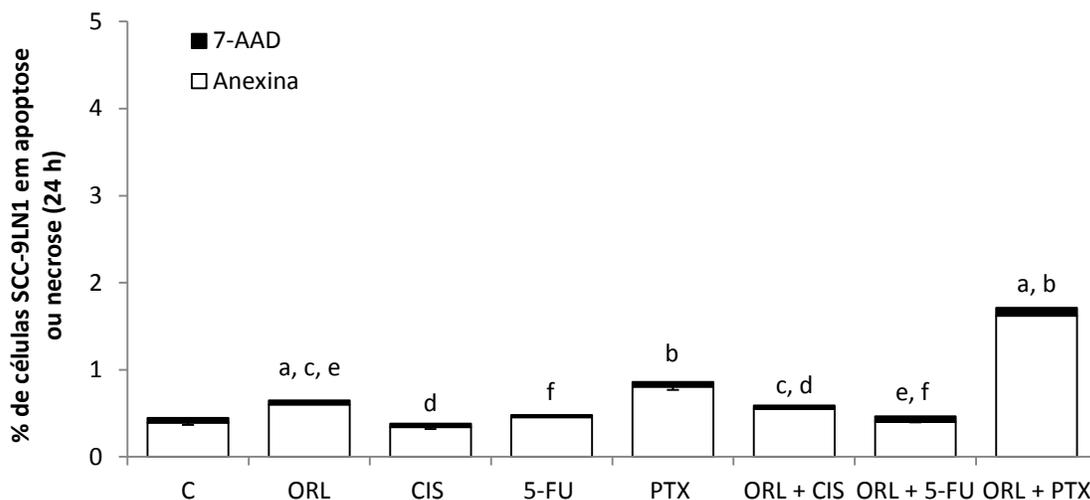


Figura 12: Análise das células SCC-9 LN1 positivas para Anexina V-PE e 7AA-D-PerCP por citometria de fluxo, após tratamento com orlistat, cisplatina, 5-FU, paclitaxel e suas combinações por 24 horas. Observa-se significativo aumento no índice apoptótico com o uso da combinação orlistat e paclitaxel, quando comparado com orlistat (a) $p = 0,0003$ ou paclitaxel (b) $p = 0,0026$ sozinhos. A combinação de orlistat e cisplatina não apresentou significância estatística quando comparada ao orlistat (c) $p = 0,052$ e pequeno aumento no índice apoptótico quando comparada a cisplatina isoladamente (d) $p = 0,03$. Já a combinação entre orlistat e 5-FU teve menor índice apoptótico quando comparado ao orlistat (e) $p = 0,02$ e não teve diferença significativa quando comparada ao 5-FU isoladamente (f) $p = 0,119$. Este gráfico representa a média de três ensaios independentes. C: controle.

No período de 36 horas de tratamento, a maior indução de apoptose continuou sendo causada pela combinação de orlistat com paclitaxel, porém com menor significância estatística quando comparada com as taxas de apoptose induzidas por paclitaxel isoladamente (**Figura 13**). As demais combinações, apesar de provocarem discreto aumento com relação às drogas isoladas, não mostraram significância estatística (**Figura 13**). Após 48 horas de incubação, obtiveram-se as maiores taxas de morte celular por apoptose com a combinação de orlistat com paclitaxel, além de discreto aumento também com a combinação de orlistat e cisplatina (**Figura 14**). Já a combinação de orlistat com 5-FU reduziu os índices apoptóticos em relação ao orlistat de forma isolada (**Figura 14**).

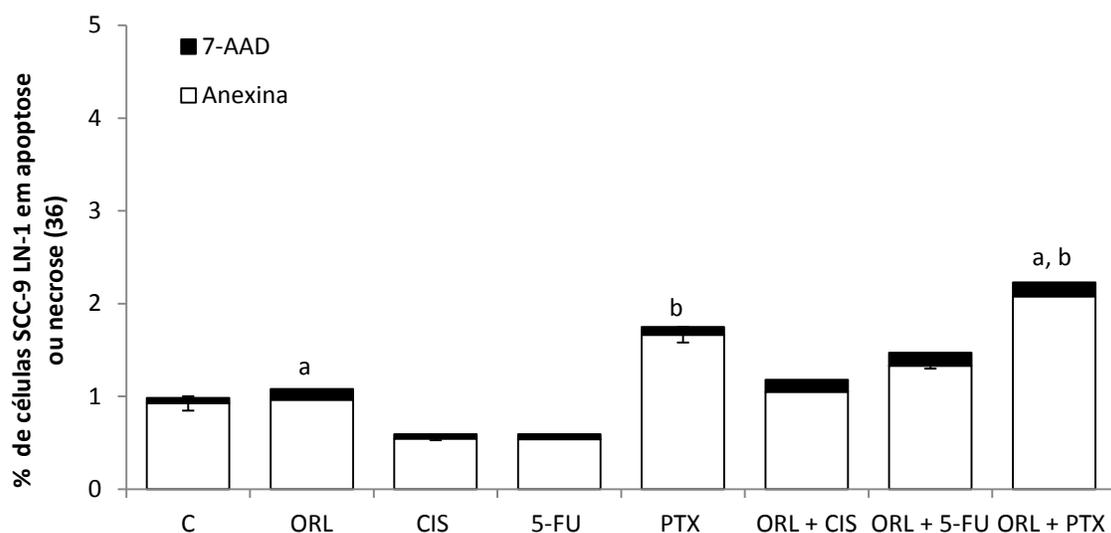


Figura 13: Análise das células SCC-9 LN1 positivas para Anexina V-PE e 7AA-D-PerCP por citometria de fluxo, após tratamento com orlistat, cisplatina, 5-FU, paclitaxel e combinações por 36 horas. Como observado no período de 24 horas, houve significativa indução de apoptose com a combinação de orlistat com paclitaxel (a, $p = 0,0063$; b, $p = 0,043$). As demais associações testadas não produziram alterações estatisticamente significantes. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

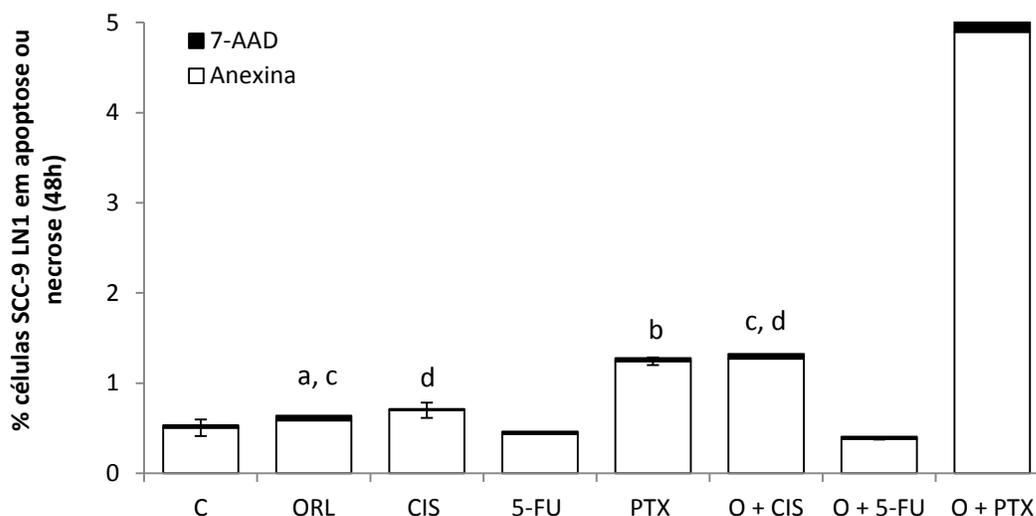


Figura 14: Análise das células SCC-9 LN1 positivas para Anexina V-PE e 7AA-D-PerCP por citometria de fluxo, após o tratamento com orlistat, cisplatina, 5-FU, paclitaxel e associações pelo período de 48 horas. Pode-se observar, como nos dois períodos anteriores (Figuras 12 e 13) um nítido aumento nos índices de apoptose com o uso da combinação de orlistat com paclitaxel (a, $p=0,0001$ em relação ao orlistat; b, $p=0,0002$ em relação ao paclitaxel). Observa-se ainda discreta indução de morte por apoptose com a combinação de cisplatina e orlistat, quando comparada ao orlistat (c, $p=0,007$) e à cisplatina (d, $p=0,002$) de maneira independente. A combinação de orlistat com 5-FU não foi efetiva para provocar apoptose, pelo menos nestas condições experimentais. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

5.4 Efeitos do orlistat, dos quimioterápicos cisplatina, 5-FU, e paclitaxel, e das suas combinações sobre a progressão do ciclo celular

Para avaliação dos efeitos do orlistat em combinação com os quimioterápicos cisplatina, 5-FU e paclitaxel na distribuição das células SCC-9 LN1 nas fases do ciclo celular, foram realizados três experimentos independentes em triplicatas, com períodos de tratamento de 24, 36 e 48 horas. Em 24 horas foi possível observar um acúmulo de células SCC-9 LN1 na fase S, com a combinação de orlistat com cisplatina, e na fase G2, com a combinação de orlistat com paclitaxel, porém estas diferenças não atingiram significância do ponto de vista estatístico (**Figura 15**).

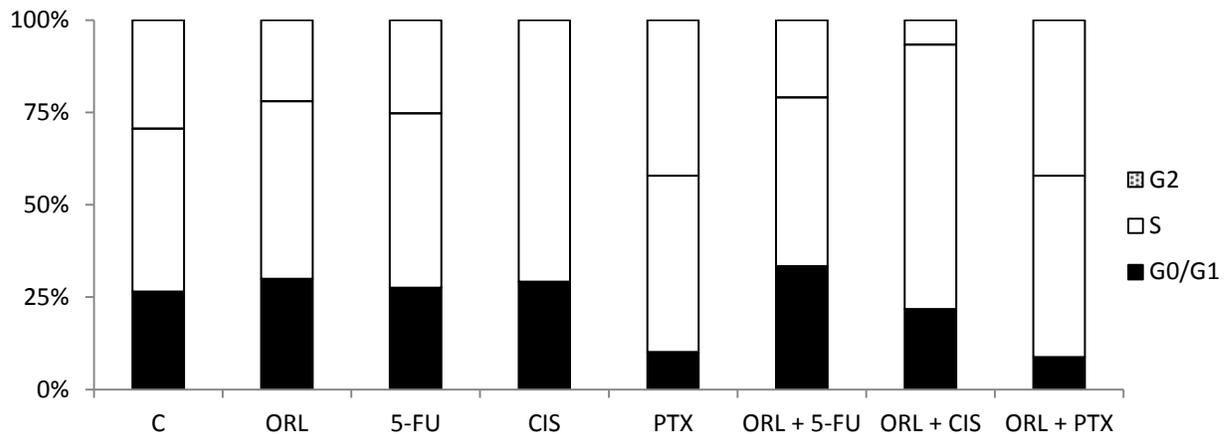


Figura 15: Análise da distribuição das células SCC-9 LN1 nas fases do ciclo celular através de citometria de fluxo após tratamentos de 24 horas com orlistat (ORL), cisplatina (CIS), 5-FU, paclitaxel (PTX) e associações (ORL + CIS, ORL + 5-FU e ORL + PTX). Pode-se observar um acúmulo de células na fase S com a combinação de orlistat com cisplatina, semelhante ao que ocorre com cisplatina isoladamente. O orlistat, juntamente com paclitaxel, provocou acúmulo de células em G2, como ocorreu com paclitaxel sozinho (42%). Os dados mostrados neste gráfico são de um experimento representativo.

Após um período de 36 horas, as células SCC-9 LN1 tratadas somente com cisplatina ou com a associação de orlistat e cisplatina estavam todas na fase S (**Figura 16**). Aumento da porcentagem de células na fase S também foi característico do tratamento com paclitaxel isolado ou combinado com orlistat (**Figura 16**). Em 48 horas, observou-se um aumento da porcentagem de células na fase G1 com cisplatina, em comparação com os períodos anteriores (**Figura 17**). Já com paclitaxel ocorreu retorno das células para a fase G2, quando comparado com o tempo experimental anterior, ao passo que orlistat e 5-FU mantiveram perfis semelhantes (**Figura 17**). Na **figura 18** podemos observar a progressão das células SCC-9 LN1 tratadas com orlistat, cisplatina, 5-FU, paclitaxel e combinações pelas fases do ciclo celular em todos os tempos de tratamento estabelecidos.

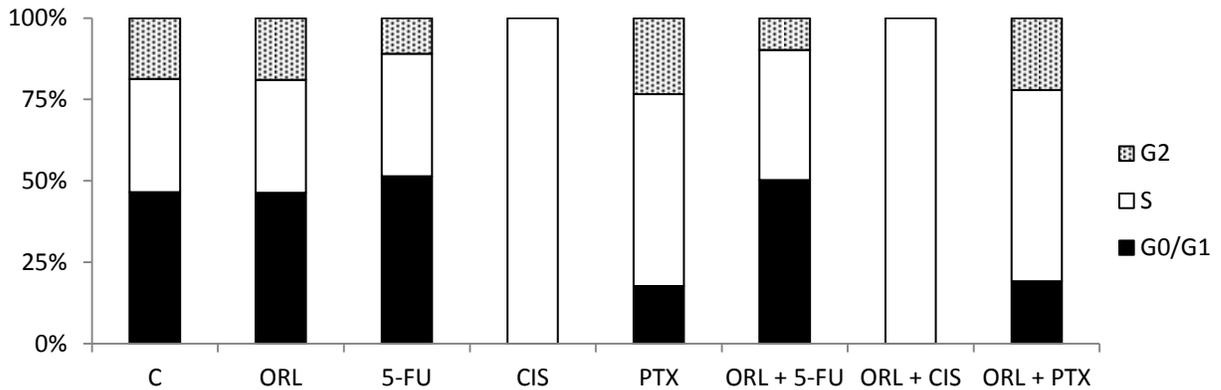


Figura 16: Análise da distribuição das células SCC-9 LN1 nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo após 36 horas com os mesmos tratamentos descritos na figura 15. Observa-se que as células incubadas com a cisplatina isolada ou em combinação com orlistat apresentaram-se todas na fase S. Observa-se também um aumento na porcentagem de células na fase S com paclitaxel sozinho ou combinado com orlistat. Gráfico representativo de um experimento

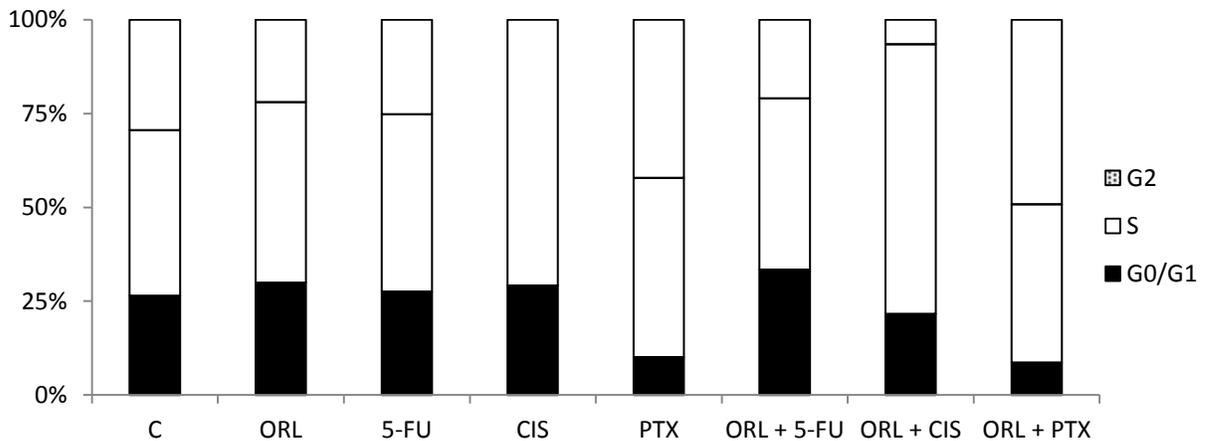


Figura 17: Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo em células SCC-9 LN1 após 48 horas dos tratamentos descritos na figura 15. Pode-se observar que nos tratamentos com cisplatina cerca de 70% das células estão na fase S e nos tratamentos com paclitaxel, aproximadamente 50 % das células encontram-se na fase G2. Gráfico representativo de um experimento.

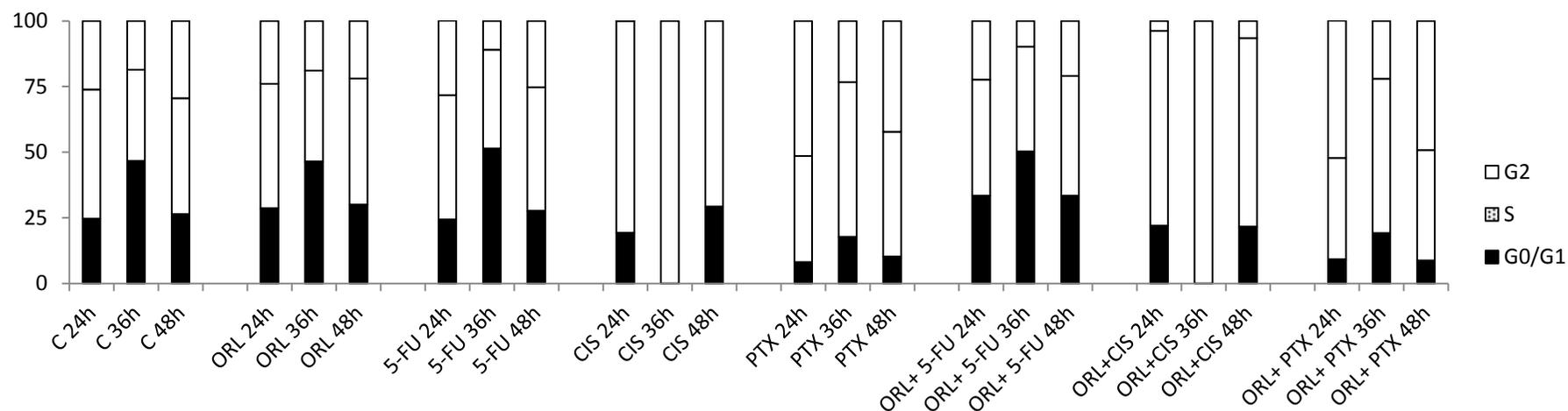


Figura 18: Análise das fases do ciclo celular das células SCC-9 LN1 por citometria de fluxo após tratamentos com orlistat, cisplatina, 5-FU, paclitaxel e suas combinações, nos tempos de 24, 36 e 48 horas. Neste gráfico podemos observar os diversos tratamentos mostrados nas figuras 15, 16 e 17 agrupados, para mostrar a evolução do ciclo celular nos diferentes tempos de incubação. O orlistat sozinho, na concentração utilizada, não alterou a progressão do ciclo celular e, de maneira geral, não mudou o resultado quando combinado com outras drogas. A cisplatina provocou acúmulo de células na fase S, o 5-FU não mostrou grandes diferenças com relação aos controles e, finalmente o paclitaxel aumentou a porcentagem de células na fase G2.

5.5 Avaliação dos efeitos do orlistat e das combinações sobre a secreção dos fatores VEGFA e VEGF_{165b} nas células SCC-9 LN1

Para verificar se o tratamento com orlistat e com os quimioterápicos isolados ou em combinação com orlistat poderia alterar a secreção das proteínas VEGFA e VEGF_{165b}, as células SCC-9 LN1 foram tratadas por 24 horas com as drogas em seus respectivos IC₅₀. Não houve alteração significativa na secreção de VEGFA pelas células SCC-9 LN1 tratadas com orlistat, em comparação com a combinação de orlistat com paclitaxel e com paclitaxel isolado (**Figura 19**). As células tratadas com orlistat apresentaram maior secreção de VEGFA quando comparadas com a combinação de orlistat com cisplatina e cisplatina isolada (**Figura 20**) e com 5-FU isolado ou combinado com orlistat (**Figura 21**). Tanto a cisplatina como o 5-FU causou redução na secreção de VEGFA pelas células SCC-9 LN1.

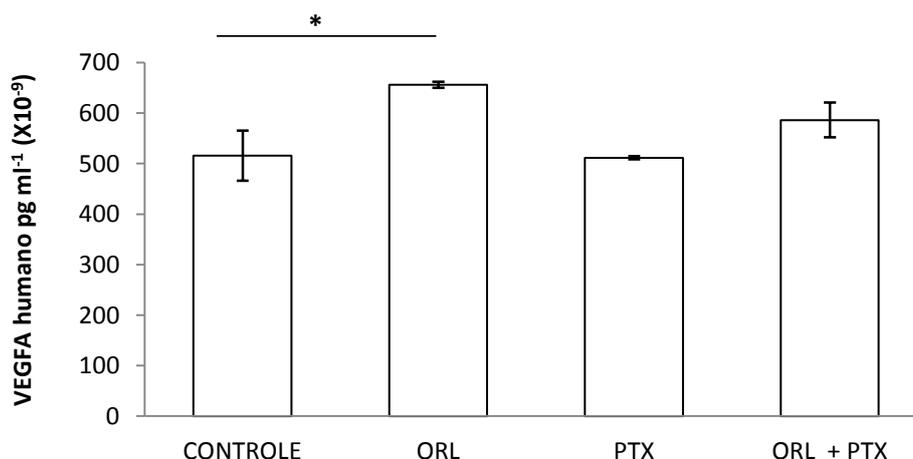


Figura 19: Secreção de VEGFA pelas células SCC-9 LN1 avaliada por ELISA, após 24 horas de tratamento com orlistat, paclitaxel e com a combinação das duas drogas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes com relação à combinação, embora orlistat sozinho tenha provocado discreto aumento ($p^* = 0,05$). Gráfico representando a média de três experimentos.

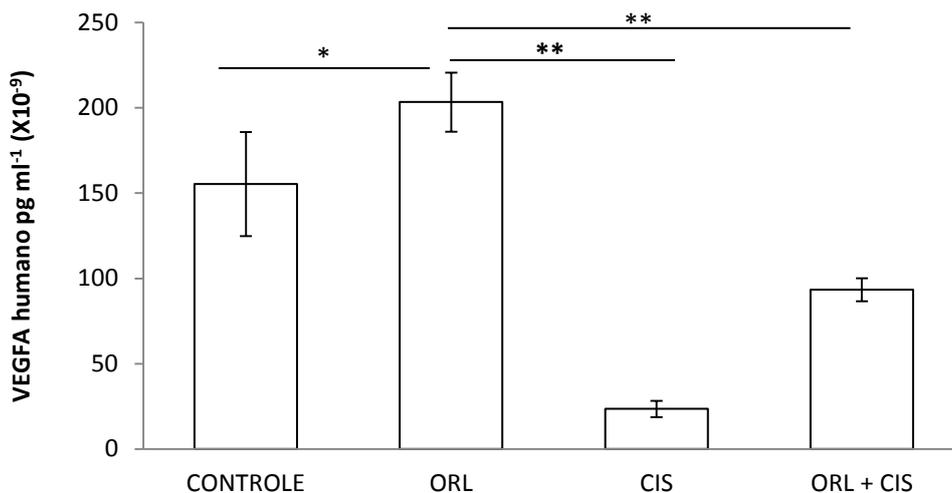


Figura 20: Secreção de VEGFA pelas células SCC-9 LN1 avaliada por ELISA, após 24 horas de tratamento com orlistat, cisplatina e a combinação destas. Podemos observar redução da secreção de VEGFA nas células tratadas com cisplatina sozinha ($p^{**} = 0,003$) e com a combinação ($p^{**} = 0,007$), em comparação com as células tratadas somente com orlistat, que por sua vez provocou discreto aumento com relação ao controle ($p^* = 0,06$). Gráfico representando a média de três experimentos.

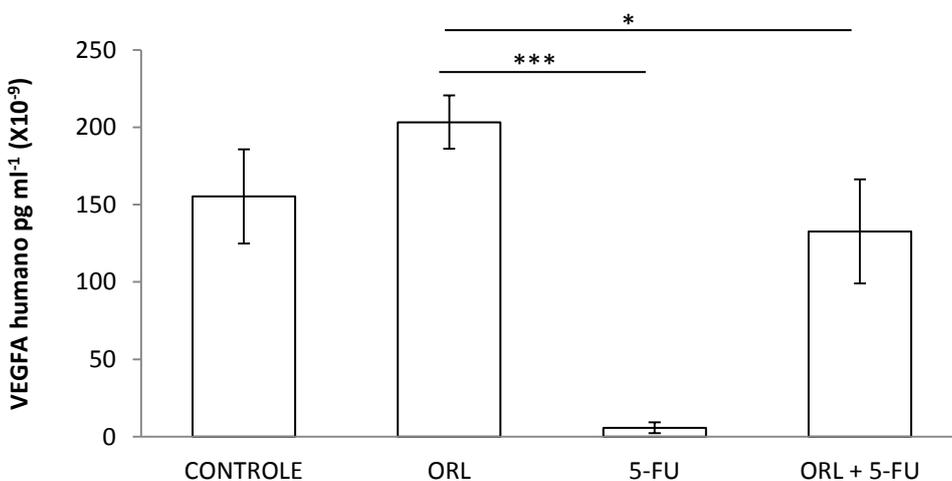


Figura 21: Secreção de VEGFA após 24 de tratamento das células SCC-9 LN1 com orlistat, 5-FU ou combinação destas drogas, avaliada por ELISA. Em relação ao controle, orlistat provocou discreto aumento, no entanto, 5-FU inibiu significativamente a secreção de VEGFA em comparação com as células tratadas somente com orlistat ($p^{***} = 0,0008$). Diminuição na secreção deste fator também foi detectada nas células tratadas com a combinação, porém menos intensa que com 5-FU sozinho ($p^* = 0,02$). Gráfico representando a média de três experimentos.

Também foi avaliada a secreção da proteína VEGF_{165b} após o mesmo tempo de tratamento. A secreção deste fator foi discretamente maior nas células tratadas com orlistat, em relação aos controles feitos com etanol (**Figuras 22, 23 e 24**). Paclitaxel, cisplatina e 5-FU provocaram intensa redução da quantidade de VEGF_{165b} em comparação com orlistat sozinho, o que foi de certa forma recuperado nas combinações destas drogas com orlistat (**Figuras 22, 23 e 24**).

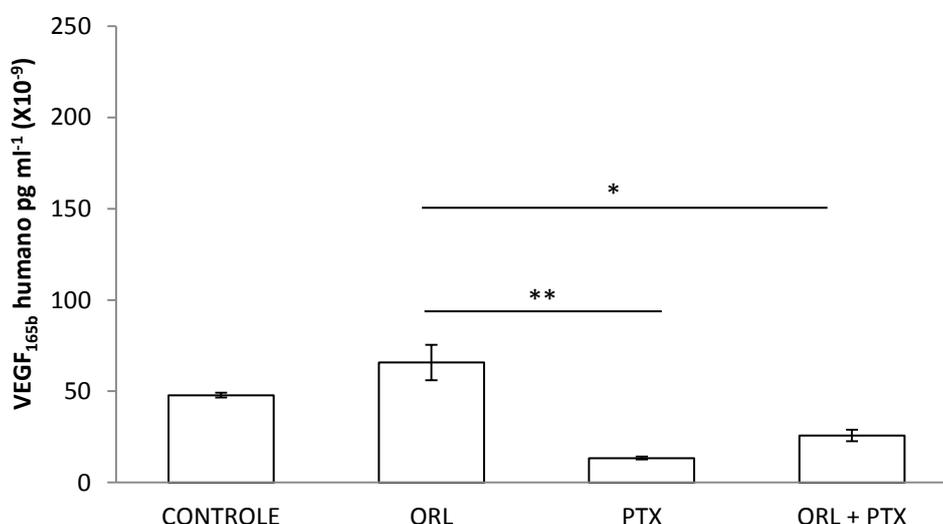


Figura 22: Estudo da secreção de VEGF_{165b} no meio de cultura de células SCC-9 LN1 após 24 de tratamento com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) ou combinação destas através de ELISA. Observa-se discreto aumento na quantidade de VEGF_{165b} nas células tratadas com orlistat isoladamente e redução com paclitaxel sozinho ($p^{**} = 0,008$) ou combinado ao orlistat ($p^* = 0,01$). Gráfico representando a média de três experimentos

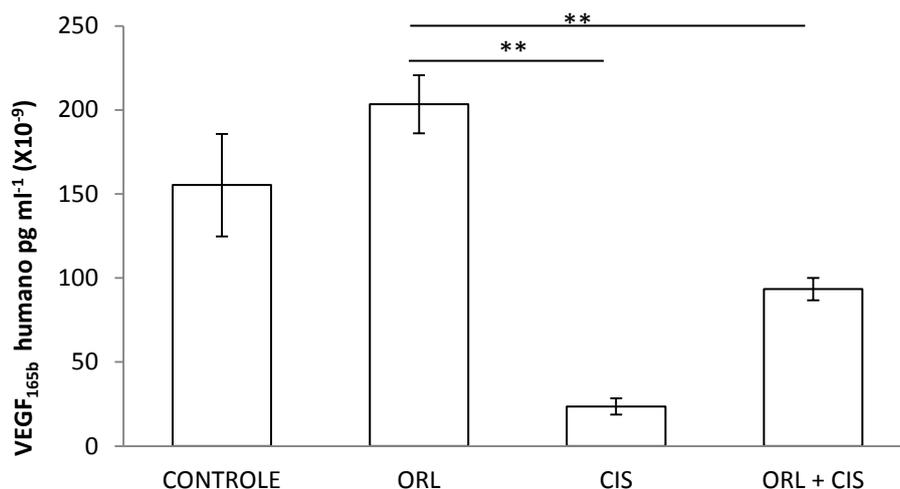


Figura 23: Secreção de VEGF_{165b} após 24 de tratamento das células SCC-9 LN1 com orlistat (ORL), cisplatina (CIS) e com a combinação destas drogas avaliada por ELISA. Observa-se uma maior secreção deste fator pelas células tratadas com orlistat em relação ao controle, intensa diminuição nas células tratadas com cisplatina sozinha ($p^{**} = 0,001$) ou com a combinação ($p^{**} = 0,007$), em comparação com orlistat isoladamente. Note que a adição de orlistat juntamente com a cisplatina restabelece parcialmente a secreção de VEGF_{165b}. Este gráfico representa a média de três experimentos.

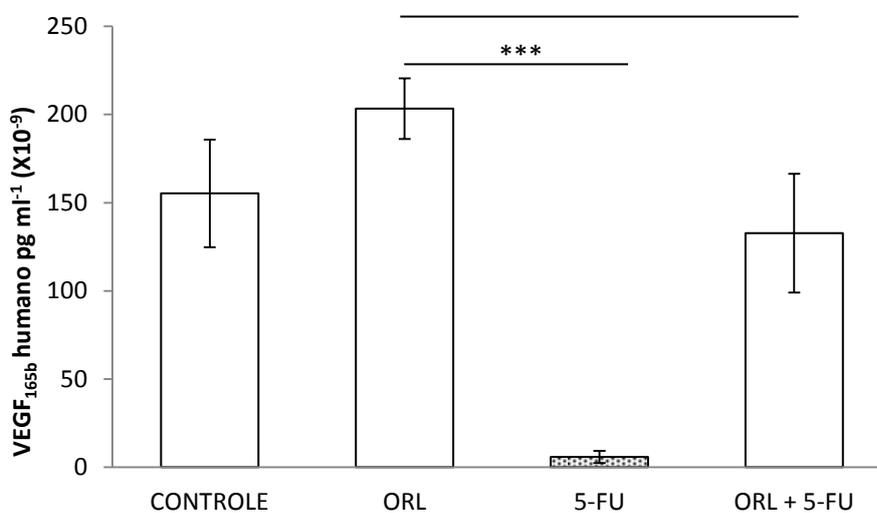


Figura 24: Análise da produção de VEGF_{165b} pelas células SCC-9 LN1 após 24 de tratamento com orlistat (ORL), 5-FU ou com a combinação destas drogas através de ELISA. Note aumento na concentração deste fator no meio de cultura das células incubadas somente com orlistat, em relação ao controle, e marcante redução no tratamento somente com 5-FU ($p^{***} = 0,0008$). A mistura de orlistat com 5-FU restabeleceu parcialmente a secreção de VEGF_{165b} ($p = 0,09$). Gráfico representando a média de três experimentos.

6 DISCUSSÃO

FASN é uma enzima com papel central na produção endógena de ácidos graxos e vem sendo apontada como uma nova oncoproteína em tumores sólidos. Diversos estudos têm mostrado sua importância como potencial alvo terapêutico, por ter elevada expressão bem documentada em diversas neoplasias malignas, dentre as quais se incluem os CECs orais (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008; Alò *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Tsuji *et al.*, 2004; Orita *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002; Visca *et al.*, 2003; Horiguchi *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011; Vlad *et al.*, 1999; Kapur *et al.*, 2005; Takahiro *et al.*, 2003; Uddin *et al.*, 2010). Os CECs orais, principalmente aqueles localizados na língua, apresentam crescimento invasivo e perineural, recidivas precoces e frequentes metástases nos linfonodos regionais, têm uma taxa de sobrevida global em cinco anos de aproximadamente 50% e representam uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento (Scully & Bagan, 2009; Warnakulasuriya, 2009; da Silva *et al.*, 2011).

O orlistat é um inibidor de lipases pancreáticas e gástricas, originalmente desenvolvido como droga antiobesidade, que teve seu potencial como inibidor de FASN descrito por Kridel *et al.* (2004) através de análises proteômicas em câncer de próstata. Diversos estudos mostram que o tratamento de células provenientes de neoplasias malignas com orlistat resulta em bloqueio da progressão do ciclo celular, redução da proliferação, aumento das taxas de morte celular por apoptose, inibição da angiogênese e sensibilização à ação de quimioterápicos (de Schrijver *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2004a; Carvalho *et al.*, 2008; Dowling *et al.*, 2009; Murata *et al.*, 2010; Zecchin *et al.*, 2011; Browne *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008). Em recente estudo realizado no laboratório de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP, Agostini *et al.* (2013) observaram em modelo ortotópico de CEC de língua que os tumores primários do grupo tratado com orlistat apresentam volume significativamente menor do que os tumores controle, com nítida redução dos índices de proliferação celular. Os mesmos autores observaram também uma redução de

aproximadamente 43% do número de linfonodos metastáticos no grupo tratado com orlistat, em comparação com o grupo controle. Os experimentos apresentados nesta dissertação de mestrado foram idealizados para avaliar o potencial terapêutico da combinação do orlistat com quimioterápicos utilizados na prática clínica para tratamento do CEC oral, como cisplatina, 5-FU e paclitaxel. A hipótese de nosso grupo de pesquisa é que este tipo de combinação pode aumentar ainda mais o efeito da inibição de FASN no modelo ortotópico desenvolvido por Agostini *et al.* (2013).

A terapia combinada é uma estratégia para a potencialização dos resultados e superação das taxas de resistência aos medicamentos, melhorando a resposta ao tratamento (Damaraju *et al.*, 2007). Alguns tipos de neoplasias malignas, como o coriocarcinoma e o linfoma de Burkitt, se caracterizam como exceção e podem ser curadas com um único agente quimioterápico. No entanto, a ação de drogas sobre grupos celulares com alta heterogeneidade, como ocorre na maioria dos tumores em estágio avançado, é limitada, sendo em geral muito difícil obter bons resultados através da administração de um único agente quimioterápico (Kogashiva & Kohno, 2013). A elevada expressão de FASN em diversos tipos de neoplasias malignas sugere que esta via metabólica é comum a vários cânceres e que combinações de agentes quimioterápicos convencionais com inibidores desta enzima podem resultar em aumento da eficácia da quimioterapia.

Para avaliarmos a natureza de combinações entre drogas, utilizamos o método matemático de Chou e Talalay (1984), que determina se há sinergismo, adição ou antagonismo. Baseado na lei de ação das massas e no princípio do efeito-médio, este modelo avalia o efeito médio de cada combinação em diferentes doses em comparação aos efeitos médios de cada droga isolada. Este método, com mais de 900 citações na literatura, é empregado *in vitro*, para avaliação dos efeitos combinados de drogas, principalmente as antineoplásicas, como uma espécie de triagem pré-clínica (revisado por Zhao *et al.*, 2004). Os resultados aqui apresentados demonstram valores de CI sinérgicos para as combinações orlistat com 5-FU (CI = 0,63) e orlistat com Paclitaxel (CI = 0,36), sendo a maior grandeza sinérgica a da

segunda combinação, com menor valor de CI. Efeito aditivo foi detectado para a combinação de orlistat com cisplatina (CI = 1) e antagonismo para a mistura de orlistat com cisplatina e 5-FU (CI = 1,54). É importante interpretar com cautela estes dados, pois eles são decorrentes de ensaios *in vitro* que avaliam ou não a presença de células após o período de exposição à droga, através da coloração do DNA das células remanescentes com cristal violeta. A complexidade dos eventos biológicos desencadeados por cada droga, que ocorrem mesmo antes da morte da célula, não pode ser avaliada por esta técnica. Por isto, para melhor compreender estes resultados, testamos essas mesmas combinações em seus respectivos IC₅₀ em ensaios de apoptose e de ciclo celular nas células SCC-9 LN1.

Agostini *et al.* (2013) mostraram recentemente que a inibição de FASN nas células SCC-9 LN1 tratadas com orlistat, na concentração de 200 µM, afeta tanto a proliferação quanto a sobrevivência destas. Com o intuito de reduzir a dose de orlistat utilizada por Agostini *et al.* (2013) e evitar possíveis efeitos citotóxicos inespecíficos gerados pela interação do medicamento com proteínas envolvidas em outros processos e vias de sinalização, determinamos aqui as concentrações capazes de reduzir a viabilidade das células SCC-9 LN1 em 50% (IC₅₀). Nestas concentrações, a combinação de orlistat com paclitaxel potencializou a morte celular por apoptose e a presença do orlistat nas combinações com cisplatina, 5-FU ou paclitaxel não interferiu no efeito dos quimioterápicos sobre o ciclo celular.

A indução de apoptose é um dos efeitos mais procurados pelo tratamento quimioterápico em células malignas. Os mecanismos que associam a inibição da atividade de FASN com a indução de apoptose ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, o acúmulo de malonil-CoA 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 elevada regulação de genes que regulam a parada do ciclo celular e apoptose. Zecchin *et al.* (2011)

demonstraram que, em células B16-F10, a inibição de FASN com cerulenina ou com orlistat inibe a proliferação e induz morte por apoptose através da via mitocondrial ou intrínseca, com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3. Neste mesmo estudo, a apoptose induzida por orlistat foi precedida por estresse oxidativo e aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$, sendo independente da participação de p53, calcineurina ou da abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

O orlistat já demonstrou potentes efeitos antiproliferativos e pró-apotóticos em células derivadas de cânceres de próstata, mama, estômago e ovário, além de melanoma, retinoblastoma e linfoma de células do manto (Kridel *et al.*, 2004; Menendez & Lupu, 2005a; Dowling *et al.*, 2009; Menendez *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008; Vandhana *et al.*, 2013; Gelebart *et al.*, 2012). Em estudos experimentais *in vivo*, orlistat revelou atividade antitumoral em modelo xenográfico de câncer de próstata (Kridel *et al.*, 2004), aumentou as taxas de sobrevida em camundongos geneticamente modificados que desenvolvem espontaneamente câncer gastrointestinal (Dowling *et al.*, 2009) e reduziu metástases para os linfonodos mediastínicos em melanomas (Carvalho *et al.*, 2008) e para linfonodos cervicais em CEC de língua (Agostini *et al.*, 2013).

O paclitaxel é capaz de induzir apoptose independente do estado de p53, através da sua ação estabilizadora dos microtúbulos (Zoli *et al.*, 2005) em células derivadas de cânceres de mama, ovário, estômago, pulmão, cabeça e pescoço, além de melanoma e osteossarcoma (Zoli *et al.*, 2005; Sugimura *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2005; Hsiao *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2013). Kalechman *et al.* (2000) estudaram os efeitos da combinação de paclitaxel com o imunomodulador AS101 em modelo murino de melanoma induzido por células B16. Este tratamento refletiu em aumento da sobrevida de 63,3%, além de significativa redução do volume tumoral, quando comparado com o grupo controle. Shimura *et al.* (2014) mostraram em modelo xenográfico metastático de câncer de estômago, que o tratamento com paclitaxel é capaz de reduzir o volume e a quantidade de metástases peritoneais. Neste estudo, mostramos que orlistat associado ao paclitaxel apresenta efeito sinérgico, com

aumento significativo dos efeitos citotóxicos de ambas as drogas isoladamente nos três períodos de tempo estudados (24, 36 e 48 horas). Estes dados corroboram com aqueles encontrados por Menendez *et al.* (2005c), que demonstraram que a administração conjunta de inibidores de FASN (cerulenina ou c75) e medicamentos antitubulínicos (paclitaxel, docetaxel e vinorelbine) no tratamento de células derivadas de câncer de mama humano, tem efeito citotóxico sinérgico por elevar as taxas de apoptose.

Observamos também no presente trabalho aumento no índice de apoptose das células SCC-9 LN1 tratadas com a combinação de orlistat com cisplatina, no tempo de 48 horas, em comparação aos tratamentos isolados. A cisplatina é um dos agentes antitumorais mais potentes, exibindo atividade clínica contra uma variedade de neoplasias malignas, como os cânceres de testículo, ovários, bexiga, esôfago, pulmão, mama, colo do útero, cabeça e pescoço, estômago e próstata, bem como linfoma de Hodgkin e linfomas não-Hodgkin, neuroblastoma, sarcomas, melanoma e mesotelioma (revisado por Florea & Büsselberg, 2011). Sua ação citotóxica provém da formação de adutos no DNA, que ativam várias vias de transdução de sinais, incluindo as de p53, p73 e MAPK, e culminam em ativação de apoptose (Siddik, 2003). Clinicamente, cisplatina é usada em associação a outros quimioterápicos, como 5-FU, gemcitabine, docetaxel e paclitaxel, a fim de minimizar os mecanismos de resistência (Cereda *et al.*, 2010; Dueñas-González *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2012; Vermorken *et al.*, 2007). Outro objetivo da terapia combinada é a ativação de diferentes vias de transdução de sinais que podem levar ao aumento de apoptose (Florea & Büsselberg, 2011).

Vazquez-Martin *et al.* (2007) associaram o inibidor de FASN cerulenina ao 5-FU no tratamento de células SK-Br3, MCF-7 e MDAMB-231, derivadas de câncer de mama. As células foram expostas ao tratamento simultâneo por 24 horas, 5-FU seguido pela cerulenina e cerulenina seguida pelo 5-FU. Foi observado que o tratamento simultâneo foi capaz de aumentar a eficácia de 5-FU em 20, 81 e 58 vezes nas células SK-Br3, MCF-7 e MDAMB-231, respectivamente. O pré-tratamento com cerulenina por 24 horas, seguido por 5-FU por mais 24 horas, aumentou a eficácia de 5-FU em 31, 87 e 126

vezes enquanto que o pré-tratamento com 5-FU por 24 horas, seguido por cerulenina por 24 horas, foi capaz de aumentar a ação de 5-FU em 107, 20 e 18 vezes nas mesmas células. No presente trabalho, a análise de Chou e Talalay mostrou sinergismo moderado para combinação de orlistat com 5-FU, o que não ficou evidente quando avaliamos as taxas de apoptose, o ciclo celular e a expressão das proteínas VEGF. Um dos mecanismos sugeridos por Vazquez-Martin *et al.* (2007) através dos quais o bloqueio de FASN aumenta a ação do 5-FU em células de câncer de mama é a redução da quantidade intracelular de diglicerídeos, precursores diretos para a síntese de fosfolipídios. O maior acúmulo de fosfolipídios nas células em divisão ocorre na fase S, assim, espera-se que as células na fase S estejam mais sensíveis ao metabolismo fosfolipídico. Assim, o tratamento prévio com 5-FU promove parada precoce das células na fase S tornando-as mais sensíveis aos efeitos da inibição de FASN por cerulenina. Considerando que o 5-FU é um agente quimioterápico de ação na fase S do ciclo celular e os inibidores de FASN inibem a progressão para esta fase, o pré-tratamento com cerulenina pode bloquear ou reduzir a incorporação de 5-FU ao DNA, tornando o tratamento menos eficaz.

Verificamos também, os efeitos dessas combinações sobre a progressão do ciclo celular, uma vez que a inibição de FASN inibe a proliferação de diversas linhagens tumorais justamente por inibir a síntese de ácidos graxos necessários à síntese de membranas (Pizer *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2001; Chirala *et al.*, 2003, Menendez *et al.*, 2005b; Ho *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2010). Nas células tumorais, a inibição de FASN com orlistat causa diminuição da síntese de DNA, inibição da progressão para a fase S do ciclo celular e consequente morte por apoptose (Pizer *et al.*, 1998b, Kridel *et al.*, 2004). Menendez *et al.* (2005b, 2005a) demonstraram que o tratamento de linhagens celulares derivadas de carcinoma de estômago (NCI-N87) e de mama (SK-Br3) com orlistat causa um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, retardando a entrada na fase S. Resultados semelhantes também foram observados no trabalho de Carvalho *et al.* (2008), em células derivadas de melanoma murino. Está claro também na literatura, que orlistat causa redução

da quantidade de Skp2, conseqüente acúmulo de p27^{kip1} e ativação da via de Rb (Knowles *et al.*, 2004, Menendez *et al.*, 2004b). No presente trabalho, verificamos que a associação de orlistat com cisplatina causa bloqueio do ciclo celular na fase S após 36 horas, sendo as maiores taxas de apoptose desta combinação em 48 horas.

A ligação do paclitaxel com a subunidade β dos microtúbulos resulta em parada do ciclo celular em G2/M. Associado ao orlistat, observamos aqui um aumento progressivo de células na fase G2/M nos tempos de 36 e 48 horas, chegando a 50% de células nesta fase. Em baixas concentrações, o paclitaxel altera a dinâmica dos microtúbulos, o que pode inibir a formação de fusos mitóticos, ao passo que em altas concentrações resulta em danos aos microtúbulos, porém não é claro ainda como paclitaxel atua dependendo das concentrações (Das *et al.*, 2001).

Angiogênese é um processo necessário para o crescimento, progressão e disseminação tumoral. Em vários estudos, o aumento da densidade de microvasos e a elevada expressão de VEGFA, em CECs de cabeça e pescoço foram associados com recorrência tumoral, presença de metástases e, conseqüentemente, pior prognóstico (revisado por Codec'a *et al.*, 2012). O fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) tem papel central na angiogênese em vários processos fisiológicos e patológicos (Ferrara, 2002). O aumento da sua produção é induzido pela exposição das células tumorais a ambientes hipóxicos e mediado pelo fator HIF-1 α , cuja atividade é aumentada na hipóxia intratumoral. Outros fatores como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o PDGF, prostaglandinas COX- 2 e também IL-6 também estão envolvidos na angiogênese tumoral (Codec'a *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostram que o tratamento das células SCC-9 LN1 com orlistat aumenta discretamente a produção de VEGFA. Por outro lado, os quimioterápicos reduzem esta secreção, o que pode ser recuperado, pelo menos em parte, pela combinação com orlistat. Alguns estudos já relataram os efeitos antiangiogênicos da cisplatina, dentre eles, o realizado por Duyndam *et al.* (2007), que avaliou a expressão de VEGFA e a atividade de HIF-1 α sob normóxia e hipóxia nas células A2780, OVCAR-3 e SKOV-3, derivadas de

câncer de ovário, tratadas com cisplatina ou paclitaxel. Foi demonstrado que as células tratadas com cisplatina inibiram a expressão de VEGF induzido por hipóxia e também reprimiu a expressão da proteína HIF-1 α em todas as linhagens celulares. Já as células tratadas com paclitaxel não tiveram influência na expressão de VEGF e atividade de HIF-1 α .

A produção da proteína anti-angiogênica VEGFA_{165b}, também foi avaliada nesta pesquisa e os resultados mostram maior secreção nas células tratadas somente com orlistat, quando comparadas aos demais tratamentos. As propriedades anti-angiogênicas de orlistat já foram anteriormente relatadas. Primeiramente, Browne *et al.* (2006) observaram que a inibição de FASN por orlistat nas células endoteliais dos vasos sanguíneos inibe a proliferação por impedir a expressão de VEGFR-2 na superfície destas células. Seguin *et al.* (2012) observaram diminuição dos vasos sanguíneos peritumorais em melanomas experimentais cutâneos de camundongos tratados com orlistat, além de redução da viabilidade, da proliferação e da capacidade de formação de estruturas do tipo capilar *in vitro* por células endoteliais RAEC. No trabalho de Agostini *et al.* (2013), o tratamento das células SCC-9 LN1 com orlistat também resultou em um forte aumento da produção de VEGFA_{165b}. Vale lembrar aqui que a disseminação metastática dos CECs orais ocorre principalmente através dos vasos linfáticos para os linfonodos cervicais ipsilaterais, com ocasionais metástases contralaterais ou bilaterais (Neville *et al.*, 2009), o que torna também necessário uma detalhada avaliação dos fatores relacionados a linfangiogênese, como VEGFC e VEGFD.

Em resumo, os achados desta dissertação mostram que o tratamento com orlistat potencializa a apoptose nas células SCC-9 LN1 quando em conjunto com o quimioterápico paclitaxel, numa combinação sinérgica. Observamos também, que mesmo sendo classificada como de potencial efeito aditivo, a associação de orlistat com cisplatina também foi capaz de aumentar os índices de apoptose das mesmas células. Diante disso, ambas as combinações devem ser estudadas *in vivo*, para uma melhor avaliação do potencial de aplicação clínica de inibidores de FASN em CECs de cabeça e pescoço.

7 CONCLUSÃO

7.1 A combinação do inibidor de FASN orlistat com paclitaxel é sinérgica, de acordo com o método de Chou e Talalay.

7.2 A combinação de orlistat com 5-FU apresenta sinergismo moderado, de acordo com o método de Chou e Talalay.

7.3 A combinação de orlistat com cisplatina apresenta efeito aditivo, de acordo com o método de Chou e Talalay.

7.4 A combinação de orlistat com cisplatina e 5-FU apresenta efeito antagônico, de acordo com o método de Chou e Talalay.

7.5 As combinações de orlistat com cisplatina e de orlistat com paclitaxel aumentam as taxas de apoptose nas células SCC-9 LN1.

7.6 A combinação de orlistat com cisplatina promove acúmulo de células SCC-9 LN1 na fase S do ciclo celular, assim como ocorre com a cisplatina isoladamente, porém com menor intensidade.

7.7 A combinação de orlistat com paclitaxel promove acúmulo das células SCC-9 LN1 na fase G2 do ciclo celular, de maneira semelhante, porém menos intensa, do que o paclitaxel isoladamente.

7.8 As combinações testadas, assim como cisplatina, 5-FU e paclitaxel isoladamente, reduzem os níveis de VEGFA e de VEGF_{165b}, em comparação com o com orlistat de forma isolada.

REFERENCIAS*

Adamo V, Ferraro G, Pergolizzi S, Sergi C, Laudani A, Settineri N, et al. Paclitaxel and cisplatin in patients with recurrent and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2004 May; 40 (5): 525 - 31.

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.

Agostini M, Almeida LY, Bastos DC, Ortega RM, Moreira FS, Seguin F, et al. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces the growth and metastasis of orthotopic tongue oral squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther.* 2013 Dec 20.

Alò 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 – 88

Alò PL, Visca P, Botti C, Galati GM, Sebastiani V, Andreano T, et al. Immunohistochemical expression of human erythrocyte glucose transporter and fatty acid synthase in infiltrating breast carcinomas and adjacent typical/atypical hyperplastic or normal breast tissue. *Am J Clin Pathol.* 2001 Jul; 116 (1): 129 - 34.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008 May 17; 371(9625): 1695 - 709.

Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SJ, Hirota S, Hosobe S, et al. Mechanisms of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66 (11): 5934 - 40.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2005.

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.

Benasso M, Ponzanelli A, Merlano M, Numico G, Ricci I, Vigo V, et al. Paclitaxel, cisplatin and 5-fluorouracil in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck: a phase II trial from an Italian cooperative group. *Acta Oncol*. 2006; 45 (2): 168 - 74.

Bershtein LM, Pozharisskiĭ KM, Maksimova NA, Kovalevskiĭ Alu, Imianitov EN. An immunohistochemical study of aromatase, estrogen 4-hydroxylase and fatty acid synthetase in breast cancer tissues from BRCA1 mutation carriers. *Vopr Onkol*. 2009; 55 (1): 29 - 32.

Binder D, Hackenthal M, Graseck L, Schweisfurth H, Schäper C, Krüll M, et al. A phase II study of weekly docetaxel-cisplatin as first-line treatment for

advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009 Sep; 4 (9): 1144 - 147.

Bitu CC, Destro MF, Carrera M, da Silva SD, Graner E, Kowalski LP, et al. HOXA1 is overexpressed in oral squamous cell carcinomas and its expression is correlated with poor prognosis. *BMC Cancer.* 2012 Apr; (12) 12: 146.

Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 712 - 17.

Brink J, Ludtke ST, Yang Chao-Yuh, Gu Zei-Wei, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (1): 138 – 43.

Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, Scher RL, Richtsmeier WJ, Hars V, et al. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1998 Jun 18; 338 (25): 1798 - 804.

Brown LM, Check DP, Devessa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: changing gender patterns. *J Oncol.* 2012; 2012: 649498.

Browne CD, Hindmarsh EJ, Smith JW. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by Orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J.* 2006; 20: 2027 - 35.

Brusselmans K, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2003 Oct 10; 106 (6): 856 - 62.

Burns JE, Baird MC, Clark LJ, Burns PA, Edington K, Chapman C, et al. Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br J Cancer* 1993; 67: 1274 - 84.

Busick TL, Uchida T, Wagner FR. Preventing ultraviolet light lip injury: beachgoer awareness about lip cancer risk factors and lip protection behavior. *Dermato Surg.* 2005; 31(2): 173 - 76.

Carnelio S, Rodrigues GS, Shenoy R, Fernandes D. A brief review of common oral premalignant lesions with emphasis on their management and cancer prevention. *Indian J Surg.* 2011; 73(4): 256 - 61.

Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci.* 2003 Jul 15; 116 (Pt 14): 2987 - 98.

Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck*. 2004; 26(1): 31 - 38.

Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, 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 Dec 1; 123 (11): 2557-65.

Cereda S, Passoni P, Reni M, Viganò MG, Aldrighetti L, Nicoletti R et al. The cisplatin, epirubicin, 5-fluorouracil, gemcitabine (PEFG) regimen in advanced biliary tract adenocarcinoma. *Cancer*. 2010 May 1; 116 (9): 2208 - 14.

Chabner BA, Roberts TG Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan; 5 (1): 65 - 72.

Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, et al. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(11): 6358 - 63.

Chong G, Bhatnagar A, Cunningham D, Cosgriff TM, Harper PG, Steward W, et al. Phase III trial of 5-fluorouracil and leucovorin plus either 3H1 anti-idiotypic monoclonal antibody or placebo in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2006 Mar; 17 (3): 437 -42.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships – the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 2: 27 - 55.

Chou TC, Martin N. CompuSyn for drug combinations: PC Software and User's Guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. Paramus (NJ): Combo-Syn; 2005, (Web link: <http://www.combosyn.com/> for video demonstration).

Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010 Jan 15; 70 (2): 440 - 46.

Chuang HY, Chang YF, Hwang JJ. Antitumor effect of orlistat, a fatty acid synthase inhibitor, is via activation of caspase-3 on human colorectal carcinoma-bearing animal. *Biomed Pharmacother.* 2011 Jul; 65 (4): 286 - 92.

Clavel M, Vermorken JB, Cognetti F, Cappelaere P, de Mulder PH, Schornagel JH, et al. Randomized comparison of cisplatin, methotrexate, bleomycin and vincristine (CABO) versus cisplatin and 5-fluorouracil (CF) versus cisplatin (C) in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. A phase III study of the EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. *Ann Oncol.* 1994 Jul; 5(6): 521 - 26.

Codec`a C, Ferrari D, Bertuzzi C, Broggio F, Crepaldi F, Foa P. Angiogenesis in Head and Neck Cancer: A Review of the Literature. *Journal of Oncology.* 2012.

Cohen SM, Lippard SJ. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001; 67: 93 - 130.

Cotran, Kumar, Robbins. *Patologia-Bases patológicas das doenças.* 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Craig CR, Stitze L, Robert E. *Farmacologia moderna com aplicações clínicas.* 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

D'Erchia AM, Tullo A, Lefkimiatis K, Saccone C, Sbisa E. The fatty acid synthase is a conserved p53 family target from worm to human. *Cell Cycle.* 2006; (5) 750 - 58.

da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, Brakenhoff RH, Valentin MD, Woolgar JA, et al. Advances and applications of oral cancer basic research. *Oral Oncol.* 2011; 47: 783 - 91.

Daley T, Darling M. Nonsquamous cell malignant tumours of the oral cavity: an overview. *J Can Dent Assoc.* 2003 Oct; 69 (9): 577 - 82.

Damaraju VL, Bouffard DY, Wong CKW, Clarke ML, Mackey JR, Leblond L, et al. Synergistic activity of troxacitabine (TroxytTM) and gemcitabine in pancreatic cancer. *BMC Cancer.* 2007; 7: 121.

Das GC, Holiday D, Gallardo R, Haas C. Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Lett.* 2001 Apr 26; 165 (2): 147- 53.

De Andrade BA, León JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, Graner E, et al. Expression of fatty acid synthase (FASN) in oral nevi and melanoma. *Oral Dis.* 2011 Nov; 17 (8): 808 - 12.

De la Torre A, Romero J, Montero A, Garcia-Berrocal MI, Valcarcel FJ, Cordoba S, et al. Radiochemotherapy with cisplatin and oral tegafur in advanced head and neck cancer: long-term results of a phase II study. *Tumori.* 2008 Jul-Aug; 94 (4): 453 - 58.

De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, et al. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Research.* 2003; 63 (13): 3799 - 804.

Di Paolo A, Danesi R, Del Tacca M. Pharmacogenetics of neoplastic diseases: new trends. *Pharmacol Res.* 2004 Apr; 49 (4): 331 - 42.

Dios PD, Lestón JS. Oral cancer pain. *Oral Oncol.* 2010 Jun; 46 (6): 448 - 51.

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 Jun; 44 (6): 489 - 98.

Dragomir LP, Simionescu C, Margaritescu C, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and ki67 immunoexpression in oral squamous cell carcinomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2012; 53 (1): 89 - 93.

Du C, Ying H, Zhou J, Hu C, Zhang Y. Experience with combination of docetaxel, cisplatin plus 5-fluorouracil chemotherapy, and intensity-modulated radiotherapy for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2013 Jun; 18 (3): 464 - 71.

Dueñas-González A, Orlando M, Zhou Y, Quinlivan M, Barraclough H. Efficacy in high burden locally advanced cervical cancer with concurrent gemcitabine and cisplatin chemoradiotherapy plus adjuvant gemcitabine and cisplatin: Prognostic and predictive factors and the impact of disease stage on outcomes from a prospective randomized phase III trial. *Gynecol Oncol*. 2012 Sep;126 (3): 334 - 40.

Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol*. 1999 Mar; 17 (3): 1061-70.

Duyndam MCA, van Berkel MPA, Dorsman JC, Rockx DAP, Pinedo HM, Boven E. Cisplatin and doxorubicin repress Vascular Endothelial Growth Factor

expression and differentially down-regulate Hypoxia-inducible Factor I activity in human ovarian cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 2007; 74: 191 - 201.

Eberhard Y, Gronda M, Hurren R, Datti A, MacLean N, Ketela T, et al. Inhibition of SREBP1 sensitizes cells to death ligands. *Oncotarget*, 2011 Mar; 2 (3): 186 - 96.

Emi M, Hihara J, Hamai Y, Aoki Y, Okada M, Kenjo M, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil for esophageal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012 Jun; 69 (6): 1499 - 505.

Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc*. 2002 Nov; 68 (10): 617 - 21.

Epstein JI, Carmichael M, Partin AW. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. *Urology*, 1995; 45 (1): 81 - 86.

Feller L, Bouckaert M, Chikte UM, Wood NH, Khammissa RA, Meyerov R, et al. A short account of cancer-specificity in relation to squamous cell carcinoma. *SADJ*. 2010; 65 (7): 322 - 24.

Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, Distefano M, Filippetti F, Martinelli E, et al. Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. *Mol Pharmacol*. 2003 Jul; 64 (1): 51 - 58.

Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 795 - 803.

Fischer F, Baerenfaller K, Jiricny J. 5-Fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision and mismatch repair systems. *Gastroenterology*. 2007 Dec; 133 (6): 1858 -68.

Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*. 2010 April ; 6 (4): 551 - 62.

Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*. 2011, 3: 1351 - 137.

Forastiere AA, Metch B, Schuller DE, Ensley JF, Hutchins LF, Triozzi P, et al. Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil versus methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1992 Aug; 10 (8): 1245 - 51.

Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev*. 2003 Mar; 103 (3): 645 - 62.

Fujitani K, Hasegawa H, Hirao M, Kurokawa Y, Tsujinaka T. Feasibility study of triplet combination chemotherapy of paclitaxel, cisplatin and S-1 for advanced gastric cancer. *Anticancer Res.* 2011 Sep; 31 (9): 3085 - 91.

Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, et al. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res.* 2008; 68: 1003 - 11.

Fury MG, Pfister DG. Current recommendations for systemic therapy of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2011 Jun; 9 (6): 681- 89.

Gelebart P, Zak Z, Anand M, Belch A, Lai R. Blockade of Fatty Acid synthase triggers significant apoptosis in mantle cell lymphoma. *PLoS One* 2012; 7: e33738.

Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suárez C, Owen RP, et al. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010; 267 (7): 1001 -17.

Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, et al. Phase III Multicenter Randomized Trial of Oxaliplatin added to Chronomodulated Fluorouracil–Leucovorin as first-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2000 Jan; 18 (1): 136 - 47.

Gibson MK, Li Y, Murphy B, Hussain MH, DeConti RC, Ensley J, et al. Randomized phase III evaluation of cisplatin plus fluorouracil versus cisplatin plus paclitaxel in advanced head and neck cancer (E1395): an intergroup trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2005 May 20; 23 (15): 3562- 67.

Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ, et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2004; 5: 253 – 61.

Guerciolini R. Mode of action of Orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997; 21 (3): 12 - 23.

Haddad R, Wirth L, Costello R, Weeks L, Posner M. Phase II randomized study of concomitant chemoradiation using weekly carboplatin/paclitaxel with or without daily subcutaneous amifostine in patients with newly diagnosed locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Semin Oncol*. 2003a Dec; 30a (6 Suppl 18): 84 - 88.

Haddad R, Colevas AD, Tishler R, Busse P, Goguen L, Sullivan C, et al. Docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil-based induction chemotherapy in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: the Dana Farber Cancer Institute experience. *Cancer*. 2003b Jan 15; 97 (2): 412 - 18.

Harris SM, Mistry P, Freathy C, Brown JL, Charlton PA. Antitumour activity of XR5944 in vitro and in vivo in combination with 5-fluorouracil and irinotecan in colon cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2005 Feb 28; 92 (4): 722 - 28.

Hennequin C, Quero L, Favaudon V. Biological basis of chemo-radiotherapy associations. *Bull Cancer*. 2009 Mar; 96 (3): 329 - 36.

Herchenhorn D, Dienstmann R, Peixoto FA, de Campos FS, Santos VO, Moreira DM, et al. Phase II trial of neoadjuvant gemcitabine and cisplatin in patients with resectable bladder carcinoma. *Int Braz J Urol*. 2007 Sep-oct; 33 (5): 630 – 38.

Herman LC, Chen L, Garnett A, Feldman LE, Smith B, Weichselbaum RR, et al. Comparison of carboplatin-paclitaxel to docetaxel-cisplatin-5-fluorouracil induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2014 Jan; 50 (1): 52 - 58.

Hermesen MAJA, Xie Y, Rooimans MA, Meijer JA, Baak JPA, Plukker JTM. Cytogenetic characteristics of oral squamous cell carcinomas in Fanconi anemia. *Fam Cancer*. 2001; 1(1): 39 - 43.

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 Oct; 61 (9): 578 - 87.

Hoffmannová J, Foltán R, Vlk M, Sipos M, Horká E, Pavlíková G, et al. Hemimandibulectomy and therapeutic neck dissection with radiotherapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma involving mandible: a critical review of treatment protocol in the years 1994-2004. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jun; 39 (6): 561 - 67.

Horiguchi A, Asano T, Asano T, Ito K, Sumitomo M, Hayakawa M. Pharmacological inhibitor of fatty acid synthase suppresses growth and invasiveness of renal cancer cells. *J Urol*. 2008. Aug; 180 (2): 729 - 36.

Hsiao JR, Leu SF, Huang BM. Apoptotic mechanism of paclitaxel-induced cell death in human head and neck tumor cell lines. *J Oral Pathol Med*. 2009 Feb; 38 (2): 188 - 97.

Hsu YC, Liou YM. The anti-cancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on the signaling pathways associated with membrane receptors in MCF-7 cells. *J Cell Physiol*. 2011 Oct; 226 (10): 2721 - 30.

Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O'Sullivan B. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a meta-analysis of reported studies. *Cancer*. 2009; 115 (7): 1489 - 97.

Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 127 - 35.

Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastián V, Silipo V, La Torre G et al. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2003; 30 (1): 23 - 28.

Instituto Nacional de Câncer - INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, [acesso 2012 Set 01]. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2012>.

Instituto Nacional de Câncer - INCA. Quimioterapia. [acesso 2013 Dec 09]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101.

Iwase H, Shimada M, Tsuzuki T, Ina K, Sugihara M, Haruta J *et al*. A phase II multi-center study of triple therapy with paclitaxel, S-1 and cisplatin in patients with advanced gastric cancer. *Oncology*. 2011; 80 (1-2): 76 - 83.

Jacobs C, Lyman G, Velez-García E, Sridhar KS, Knight W, Hochster H, et al. al. A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*. 1992 Feb; 10 (2): 257 - 63.

Jayakumar A, Tai M, Huang W, Al-Fell W, HSU M, Abu-Elheiga L, et al. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92 (19): 8695-699.

Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004 Apr; 4 (4): 253 - 65.

Julka PK, Chacko RT, Nag S, Parshad R, Nair A, Oh DS, et al. A phase II study of sequential neoadjuvant gemcitabine plus doxorubicin followed by gemcitabine plus cisplatin in patients with operable breast cancer: prediction of response using molecular profiling. *Br J Cancer*. 2008 Apr 22; 98 (8): 1327 - 35.

Jung JY, Kwon JH, Kim JH, Song HH, Kim I, Lee KS et al. Phase II study of the paclitaxel, cisplatin, 5-fluorouracil and leucovorin (TPFL) regimen in the treatment of advanced or metastatic gastric cancer. *Oncol Rep*. 2009 Feb; 21 (2): 523 - 29.

Kalechman Y, Longo DI, Catane R, Shani A, Albeck M, Sredni B. Synergistic anti-tumoral effect of paclitaxel (taxol)1as101in a murine model of b16 melanoma: association with ras-dependent signal-transduction pathways. *Int. j. cancer*. 2000; 86: 281 - 88.

Kapur P, Rakheja D, Roy LC, Hoang MP. Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. *Mod Pathol*. 2005. Aug; 18 (8): 1107 - 112.

Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*. 2001 Jul 1; 478 (1-2): 23 - 43.

Katayama H, Ito S, Sano T, Takahari D, Mizusawa J, Boku N et al. A Phase II Study of Systemic Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin, and S-1 (DCS) Followed by Surgery in Gastric Cancer Patients with Extensive Lymph Node Metastasis: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1002. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Jun; 42 (6): 556 - 59.

Katzung, Bertram G. Farmacologia básica e clínica. 10.ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007 Aug; 7 (8): 573 - 84.

Khaled H, Emara ME, Gaafar RM, Mansour O, Abdel Warith A, Zaghloul MS, et al. Primary chemotherapy with low-dose prolonged infusion gemcitabine and cisplatin in patients with bladder cancer: a Phase II trial. *Urol Oncol*. 2008 Mar-Apr; 26 (2): 133 - 36.

Kim HJ, Lee SG, Kim YJ, Park JE, Lee KY, Yoo YH, et al. Cytoprotective role of autophagy during paclitaxel-induced apoptosis in Saos-2 osteosarcoma cells. *Int J Oncol*. 2013 Jun; 42 (6): 1985 - 992.

Kim KS, Oh IJ, Ban HJ, Cho HJ, Kwon YS, Kim YI, et al. Comparison of docetaxel/cisplatin dosages of 75/60 and 60/60 mg/m² for the treatment of non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med*. 2012 Aug; 4 (2): 317 - 22.

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 - 545.

Kogashiwa Y, Kohno N. Combination Chemotherapy for Solid Tumors in Head and Neck. *J Drug Metab Toxicol*. 2013 Feb; 4: 141.

Kondagunta GV, Bacik J, Donadio A, Bajorin D, Marion S, Sheinfeld J, et al. Combination of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 20 ; 23(27): 6549 - 555.

Kowalski LP, Carvalho AL, Martins Priante AV, Magrin J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2005 May; 41 (5): 534 - 41.

Kridel SJ, Axelrod F, Rosenkrants N, Smith W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Research* 2004; 64: 2070 - 75.

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 - 29.

Kuemmerle NB, Rysman E, Lombardo PS, Flanagan AJ, Lipe BC, Wells WA et al. Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. *Mol Cancer Ther*. 2011 March ; 10 (3): 427 – 36.

Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL.; Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *PNAS*. 2000; 97 (7): 3450 - 454.

Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Either SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Research* 2003; 63 (1): 132 - 39.

Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology* 2002; 40 (1): 71 - 79.

Law KS, Chen HC, Liao SK. Non-cytotoxic and sublethal paclitaxel treatment potentiates the sensitivity of cultured ovarian tumor SKOV-3 cells to lysis by lymphokine-activated killer cells. *Anticancer Res.* 2007 Mar-Apr; 27 (2): 841 - 50.

Lee JS, Lee MS, Oh WK, Sul JY. Fatty acid synthase inhibition by amentoflavone induces apoptosis and antiproliferation in human breast cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2009 Aug; 32 (8): 1427 - 432.

Lee SC, Sim N, Clement MV, Yadav SK, Pervaiz S. Dominant negative Rac1 attenuates paclitaxel-induced apoptosis in human melanoma cells through upregulation of heat shock protein 27: a functional proteomic analysis. *Proteomics.* 2007 Nov; 7 (22): 4112 - 122.

Lee TK, Poon RT, Wo JY, Ma S, Guan XY, Myers JN, et al. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res.* 2007 Sep 15; 67 (18): 8800 - 809.

Li H, Lü Q, Xue H, Dong LH, Saima N, Yang HJ. Expression of epidermal fatty acid-binding protein and fatty acid synthase in infiltrating ductal breast carcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2008 Mar; 28 (3): 381 - 84.

Li J, Ping Z, Ning H. MiR-218 Impairs Tumor Growth and Increases Chemo-Sensitivity to Cisplatin in Cervical Cancer. *Int J Mol Sci*. 2012 Nov 28; 13 (12): 16053 - 64.

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 Research*. 2001; 61 (4): 1493 - 499.

Li MH, Ito D, Sanada M, Odani T, Hatori M, Iwase M, et al. Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral Oncol*. 2004 Jan; 40 (1): 63 - 70.

Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu HM. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ*. 2005 Mar; 12 (3): 292 - 303.

Li W, Fan J, Banerjee D, Bertino JR. Overexpression of p21(waf1) decreases G2-M arrest and apoptosis induced by paclitaxel in human sarcoma cells lacking both p53 and functional Rb protein. *Mol Pharmacol*. 1999 Jun; 55 (6): 1088 - 93.

Lin HL, Chang YF, Liu TY, Wu CW, Chi CW. Submicromolar paclitaxel induces apoptosis in human gastric cancer cells at early G1 phase. *Anticancer Res.* 1998 Sep-Oct; 18(5A): 3443 - 449.

Liu H, Liu Y, Zhang JT. A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7: 263 – 70.

Liu HC, Chen GG, Vlantis AC, Leung BC, Tong MC, van Hasselt CA. 5-fluorouracil mediates apoptosis and G1/S arrest in laryngeal squamous cell carcinoma via a p53-independent pathway. *Cancer J.* 2006 Nov-Dec; 12 (6): 482 - 93.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science.* 2000; 288 (5475): 2379 - 381.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003 May; 3 (5): 330 - 38.

Lupu R, Menendez JA. Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Curr Pharm Biotechnol.* 2006 Dec; 7 (6): 483 – 93.

Ma J, Liu Y, Huang XL, Zhang ZY, Myers JN, Neskey DM, et al. Induction chemotherapy decreases the rate of distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma but does not improve survival or locoregional control: a meta-analysis. *Oral Oncol.* 2012 Nov; 48 (11): 1076 - 84.

Martel PM, Bingham CM, McGraw CJ, Baker CL, Morganelli PM, Meng ML, et al. S14 protein in breast cancer cells: direct evidence of regulation by SREBP-1c, superinduction with progestin, and effects on cell growth. *Exp Cell Res.* 2006; 312: 278 - 88.

Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer.* 2009 Maio 5; 100 (9): 1369 - 372.

Matuo R. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta aos danos no DNA induzidos pelo agente antitumoral 5-Fluorouracil. [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.

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.* 2004a Aug; 12 (2): 411 - 22.

Menendez JA, Oza BP, Atlas E, Verma VA, Mehmi I, Lupu R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity antagonizes estradiol- and tamoxifen-induced agonist transactivation of estrogen receptor (ER) in human

endometrial adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2004b Jun 17; 23 (28): 4945 - 958.

Menendez JA, Vellon L, Mehmi 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*. 2004c; 101(29): 10715 - 720.

Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (XenicalTM) 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: 1253 - 267.

Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Orlistat: from antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB-2)-overexpressing gastrointestinal tumors? *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005b; 230(3): 151 - 54.

Menendez JA, Vellon L, Colomer R, Lupu R. Pharmacological and small interference RNA-mediated inhibition of breast cancer-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) synergistically enhances Taxol (paclitaxel)-induced cytotoxicity. *Int J Cancer*. 2005c May 20; 115(1): 19 - 35.

Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct; 7 (10): 763 - 77.

Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G, 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.

Moinpour CM, Donaldson GW, Liepa AM, Melemed AS, O'Shaughnessy J, Albain KS. Evaluating health-related quality-of-life therapeutic effectiveness in a clinical trial with extensive nonignorable missing data and heterogeneous response: results from a phase III randomized trial of gemcitabine plus paclitaxel versus paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Qual Life Res.* 2012 Jun; 21(5): 765-75.

Molin Y, Fayette J. Current chemotherapies for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Anticancer Drugs.* 2011 Aug; 22 (7): 621 - 25.

Murata S, Yanagisawa K, Fukunaga K, Oda T, Kobayashi A, Sasaki R et al. Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci.* 2010; 101(8): 1861 - 865.

Murphy B, Li Y, Cella D, Karnad M, Hussain A, Forestiere A, et al. Phase III study comparing cisplatin (C) and 5-fluorouracil (F) versus cisplatin & paclitaxel (T) in metastatic/recurrent head and neck cancer (MHNC). *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2001; 19: Abstr 894.

Myers JN, Greenberg JS, Mo V, Roberts D. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer.* 2001 Dec 15; 92 (12): 3030 - 36.

Nagai Y, Toita T, Wakayama A, Nakamoto T, Ooyama T, Tokura A et al. Concurrent chemoradiotherapy with paclitaxel and cisplatin for adenocarcinoma of the cervix. *Anticancer Res.* 2012 Apr; 32 (4): 1475 - 479.

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.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.

Nishiyama M, Yamamoto W, Park JS, Okamoto R, Hanaoka H, Takano H et al. Low-dose cisplatin and 5-fluorouracil in combination can repress increased gene expression of cellular resistance determinants to themselves. *Clin Cancer Res.* 1999 Sep; 5 (9): 2620-628.

Noordhuis P, Holwerda U, Van Laar JA, Van der Wilt CL, Peters GJ. A non-radioactive sensitive assay to measure 5-fluorouracil incorporation into DNA of solid tumors. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004 Oct; 23 (8-9): 1481 - 484.

Ogino S, Shima K, Baba Y, Nosho K, Irahara N, Kure S, et al. Colorectal Cancer Expression of PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma) is Associated With Good Prognosis. *Gastroenterology.* 2009 Apr; 136 (4): 1242 - 250.

Okamoto I, Yoshioka H, Takeda K, Satouchi M, Yamamoto N, Seto T *et al.* Phase I clinical study of the angiogenesis inhibitor TSU-68 combined with carboplatin and paclitaxel in chemotherapy-naive patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012 Feb; 7(2): 427 - 33.

Oksuzoglu B, Abali H, Hayran M, Yildirim N, Budakoglu B, Zengin N. Capecitabine and cisplatin combination is an active and well-tolerated doublet in the treatment of metastatic breast carcinoma patients pretreated with anthracycline and taxanes. *Chemotherapy.* 2008; 54 (5): 352 - 56.

Orita H, Coulter J, Tully E, Kuhajda FP, Gabrielson E. Inhibiting fatty acid synthase for chemoprevention of chemically induced lung tumors. *Clin Cancer Res.* 2008 Apr 15; 14 (8): 2458 - 464.

Orita H, Coulter J, Tully E, Abe M, Montgomery E, Alvarez H, et al. High levels of fatty acid synthase expression in esophageal cancers represent a potential target for therapy. *Cancer Biol Ther.* 2010 Sep; 10 (6): 549 - 54.

Pala M, Odrazka K, Holeckova P, Vitek P, Kubes J, Dvorak J, et al. Definitive radiochemotherapy with weekly cisplatin in patients with head and neck cancer; single institution outcome analysis. *J BUON.* 2012 Jul-Sep; 17 (3): 471 - 77.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55 (2): 74 - 108.

Paselk RA. Disponível em URL: <http://users.humboldt.edu/rpaselk/C438>. (Acesso 2013 Dez 5).

Pelucchi C, Talamini R, Negri E, Levi F, Conti E, Franceschi S, et al. Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. *Ann Oncol*. 2003; 14 (11): 1667 - 681.

Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5): 340-50

Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC et al. The expression of fatty acid synthase (FAS) 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 Research*. 1996; 56 (12): 2745 - 747.

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*. 1998a Aug 1; 83 (3): 528 - 37.

Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res*. 1998b; 58 (20): 4611 - 615.

Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL et al. Malonylcoenzyme is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Research* 2000; 60 (2): 213 - 18.

Pontes HA, Paiva HB, de Freitas Silva BS, Fonseca FP, da Silva FB, Pontes FS, et al. Oral candidiasis mimicking na oral squamous cell carcinoma: report of a case. *Gerodontology*. 2012; 29 (1): 70 - 74.

Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*. 2004 May-Jun; 39 (3): 155 - 65.

Price KAR, Cohen EE. Current Treatment Options for Metastatic Head and Neck Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*. 2012, 13: 35 - 46.

Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 2007 Feb; 33 (1): 9 - 23.

Rampino M, Ricardi U, Munoz F, Reali A, Barone C, Musu AR, et al. Concomitant adjuvant chemoradiotherapy with weekly low-dose cisplatin for high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck: a phase II prospective trial. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2011 Mar; 23 (2): 134 - 40.

Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, et al. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol*. 1997 Jan; 150 (1): 201 - 8.

Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Patologia oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefeld ML, Soubhia AM. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. Br J Oral Maxillofac Surg. 2009; 47: 95 - 98.

Rich TA, Shepard RC, Mosley ST. Four decades of continuing innovation with fluorouracil: current and future approaches to fluorouracil chemoradiation therapy. J Clin Oncol. 2004 Jun 1; 22 (11): 2214 - 232.

Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. Mol Cancer Res. 2003 Aug; 1 (10): 707 - 15.

Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Dei Tos AP, Fletcher JA, Loda M. Gastrointestinal stromal tumors overexpress fatty acid synthase. J Pathol. 2006; (209): 369 – 75.

Rowinsky EK, Donehower RC. The clinical pharmacology of paclitaxel (Taxol). Semin Oncol. 1993 Aug; 20(4 Suppl 3): 16 - 25.

Rowinsky EK, Chaudhry V, Forastiere AA, Sartorius SE, Ettinger DS, Grochow LB, et al. Phase I and pharmacologic study of paclitaxel and cisplatin with

granulocyte colony-stimulating factor: neuromuscular toxicity is dose-limiting. *J Clin Oncol.* 1993 Oct; 11 (10): 2010 - 20.

Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med.* 1995 Apr 13; 332 (15): 1004 - 14.

Saitoh-Sekiguchi M, Nakahara K, Kojimahara T, Ohta T, Kawagoe J, Ohnuki T, et al. Complete remission of ovarian small cell carcinoma treated with irinotecan and cisplatin: a case report. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug; 27 (4C): 2685 - 687.

Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM *et al.* High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. *Histopathology* 2011; 58: 1127 - 35.

Savva-Bordalo J, Ramalho-Carvalho J, Pinheiro M, Costa VL, Rodrigues A, Dias PC, et al. Promoter methylation and large intragenic rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. *BMC Cancer.* 2010 Sep 1; 10: 470.

Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2001; 2 (4): 239 - 51.

Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May; 45 (4-5): 301 – 8.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol.* 2000; 36: 404 - 13.

Scully C, Petti S. Overview of cancer for the healthcare team: aetiopathogenesis and early diagnosis. *Oral Oncol.* 2010 Jun; 46 (6): 402 - 6.

Sebastiani V, Visca P, Botti C, Santeusano G, Galati GM, Piccini V, et al. Fatty acid synthase is a marker of increased risk of recurrence in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004 Jan; 92 (1): 101 - 5.

Sedletska Y, Giraud-Panis MJ, Malinge JM. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005 May; 5 (3): 251 - 65.

Seguin F, Carvalho MA, Bastos DC, Agostini M, Zecchin KG, Alvarez-Flores MP, et al. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. *Br J Cancer.* 2012 Sep 4; 107 (6): 977 - 87.

Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN, et al. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian J Clin Biochem.* 2011 Oct; 26 (4): 326 - 34.

Shah US, Dhir R, Gollin SM, Chandran UR, Lewis D, Acquafondata M, et al. Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2006 Apr; 37 (4): 401 - 9.

Shen Y, Yang L, Wang Z. Treatment of early bulky cervical cancer with neoadjuvant paclitaxel, carboplatin and cisplatin prior to laparoscopic radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *Oncol Lett*. 2012 Mar; 3 (3): 641 - 45.

Shimura T, Tanaka K, Toiyama Y, Okigami M, Ide S, Kitajima T, et al. In vivo optical pathology of paclitaxel efficacy on the peritoneal metastatic xenograft model of gastric cancer using two-photon laser scanning microscopy. *Gastric Cancer*. 2014 Jan 8.

Shurbaji MS, Kuhajda FP, Pasternack GR, Thurmond TS. Expression of oncogenic antigen 519 (OA-519) in prostate cancer is a potential prognostic indicator. *Am J Clin Pathol*. 1992 May; 97 (5): 686 - 91.

Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS. Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. *Hum Pathol*. 1996 Sep; 27 (9): 917 - 21.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* (2003) 22, 7265 – 279.

Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA; Lopes MA. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncology*. 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*. 2008 Jul; 453 (1): 57 – 67.

Silva SD, Cunha IW, Nishimoto IN, Soares FA, Carraro DM, Kowalski LP, Graner E. Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*. 2009; 45: 134 - 39.

Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jun; 68 (6): 1270 - 275.

Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Review Progress in lipid Research*. 2003; 42: 289 - 317.

Soudry E, Preis M, Hod R, Hamzany Y, Hadar T, Bahar G, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. *Clin Otolaryngol*. 2010; 35 (4): 307-12.

Souza MVN. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Quim. Nova.* 2004, 27 (2): 308 - 12.

Stathopoulos GP, Dimitroulis J, Toubis M, Katis C, Karaindros D, Stathopoulos J, et al. Pemetrexed combined with paclitaxel in patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: a phase I-II trial. *Lung Cancer.* 2007 Jul; 57 (1): 66 - 71.

Sugimura M, Sagae S, Ishioka S, Nishioka Y, Tsukada K, Kudo R. Mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis in an ovarian cancer cell line and its paclitaxel-resistant clone. *Oncology.* 2004; 66 (1): 53 - 61.

Suzuki S, Horio H, Hato T, Harada M, Okuma Y, Hishima T. A case of successful preoperative chemotherapy with cisplatin and irinotecan followed by curative-intent surgery for locally advanced thymic carcinoma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2013 Mar; 61 (3): 166 - 69.

Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L et al. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 2002; 98 (1): 19 - 22.

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 - 212.

Tamatani T, Ferdous T, Takamaru N, Hara K, Kinouchi M, Kuribayashi N, et al. Antitumor efficacy of sequential treatment with docetaxel and 5-fluorouracil against human oral cancer cells. *Int J Oncol.* 2012 Sep; 41 (3): 1148 - 56.

Tamura S, Imano M, Takiuchi H, Kobayashi K, Imamoto H, Miki H et al. Phase II study of docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil (DCF) for metastatic esophageal cancer (OGSG 0403). *Anticancer Res.* 2012 Apr; 32 (4): 1403 - 408.

Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Tsukamoto H, Kamiya T, Kataoka H, et al. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *Int J Surg Oncol.* 2012; 2012 : 862879.

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. 2001; 285 (2): 217 - 23.

Torigoe T, Izumi H, Ishiguchi H, Yoshida Y, Tanabe M, Yoshida T, et al. Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005 Jan; 5 (1): 15 - 27.

Tsuji T, Yoshinaga M, Togami S, Douchi T, Nagata Y. Fatty acid synthase expression and clinicopathological findings in endometrial cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004 Jun; 83 (6): 586 – 90.

Uddin S, Hussain AR, Ahmed M, Bu R, Ahmed SO, Ajarim D, Al-Dayel F, Bavi P, Al-Kuraya KS. Inhibition of fatty acid synthase suppresses c-Met receptor kinase and induces apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther.* 2010 May; 9 (5): 1244 - 255.

Uddin S, Jehan Z, Ahmed M, Alyan M, Al-Dayel F, Hussain A, et al. Overexpression of fatty acid synthase in Middle Eastern epithelial ovarian carcinoma activates AKT and its inhibition potentiates cisplatin-induced apoptosis. *Mol Med.* 2011; 17 (7-8): 635 - 45.

Ueda SM, Yap KL, Davidson B, Tian Y, Murthy V, Wang TL, et al. Expression of Fatty Acid Synthase Depends on NAC1 and Is Associated with Recurrent Ovarian Serous Carcinomas. *J Oncol.* 2010; 175 (6): 2618 - 624.

Vandhana S, Coral K, Jayanthi U, Deepa PR, Krishnakumar S. Biochemical changes accompanying apoptotic cell death in retinoblastoma cancer cells treated with lipogenic enzyme inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1831 (9): 1458 - 66.

Vargas-Ferreira F, Nedel F, Etges A, Gomes AP, Furuse C, Tarquinio SB. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Braz Dent J.* 2012; 23 (5): 586 - 90.

Vazquez-Martin A, Ropero S, Brunet J, Colomer R, Menendez J. Inhibition of Fatty Acid Synthase (FASN) synergistically enhances the efficacy of 5-fluorouracil in breast carcinoma cells. *Oncology reports*. 2007; 18: 973 - 80.

Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2007 Oct 25; 357 (17): 1695-704.

Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep 11; 359 (11): 1116 – 127.

Visca, P.; Sebastiani, V.; Pizer, E. S.; 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 - 39.

Visca P, Sebastiani V, Botti C, Diodoro MG, Lasagni RP, Romagnoli F, et al. Fatty acid synthase (FAS) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. *Anticancer Res*. 2004 Nov-Dec; 24 (6): 4169 - 173.

Vlad LD, Axaotis CA, Merino MJ. Fatty acid synthase is highly expressed in aggressive thyroid tumors. *Mod Pathol*. 1999; 12: 70.

Wakil, S. J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 1989; 28 (11): 4523 - 530.

Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Apr; 4 (4): 307-20.

Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene.* 2005 May 19; 24 (22): 3574 - 582.

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 Jun; 9 (6): 441 - 47.

Wang Y, Zhang X, Tan W, Fu J, Zhang W. Significance of fatty acid synthase expression in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2002 May; 24 (3): 271 - 73.

Warnakulasuriya KA, Ralhan R. Clinical, pathological, cellular and molecular lesions caused by oral smokeless tobacco--a review. *J Oral Pathol Med.* 2007 Feb; 36 (2): 63 - 77.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology.* 2009; 45: 309 – 16.

Watanabe T, Yoshikawa T, Kameda Y, Aoyama T, Hayashi T, Ogata T et al. Pathological complete response of locally advanced gastric cancer after four courses of neoadjuvant chemotherapy with paclitaxel plus cisplatin: report of a case. *Surg Today*. 2012 Oct; 42 (10): 983 – 87.

Westra WH. The changing face of head and neck cancer in the 21 st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol*. 2009; 3(1): 78 - 81.

Wilson L, Jordan MA. New microtubule/tubulin-targeted anticancer drugs and novel chemotherapeutic strategies. *J Chemother*. 2004 Nov; 16 (4): 83 - 85.

Wirth LJ, Allen AM, Posner MR, Haddad RI, Li Y, Clark JR, Busse PM, et al. Phase I dose-finding study of paclitaxel with panitumumab, carboplatin and intensity-modulated radiotherapy in patients with locally advanced squamous cell cancer of the head and neck. *Ann Oncol*. 2010 Feb; 21 (2): 342 - 47.

Witkiewicz AK, Nguyen KH, Dasgupta A, Kennedy EP, Yeo CJ, Lisanti MP, et al. Co-expression of fatty acid synthase and caveolin-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical outcome. *Cell Cycle*. 2008 Oct; 7 (19): 3021 - 25.

Woods CM, Zhu J, McQueney PA, Bollag D, Lazarides E. Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med*. 1995 Jul; 1(5): 506 - 26.

Woolgar JA, Hall GL. Determinants of outcome following surgery for oral squamous cell carcinoma. *Future Oncol.* 2009; 5(1): 51-61.

Worden FP, Moon J, Samlowski W, Clark JI, Dakhil SR, Williamson S *et al.* A phase II evaluation of a 3-hour infusion of paclitaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil in patients with advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck: Southwest Oncology Group study 0007. *Cancer.* 2006 Jul 15; 107 (2): 319 - 27.

Wortman MD, Clegg DJ, D'Alessio D, Woods SC, Seeley RJ. C75 inhibits food intake by increasing CNS glucose metabolism. *Nat Med.* 2003; 9 (5): 483 - 85.

Yang X, Uziely B, Groshen S, Lukas J, Israel V, Russell C, *et al.* MDR1 gene expression in primary and advanced breast cancer. *Lab Invest.* 1999 Mar; 79 (3): 271 - 80.

Yang Y, Liu H, Li Z, Zhao Z, Yip-Schneider M, Fan Q, *et al.* Role of fatty acid synthase in gemcitabine and radiation resistance of pancreatic cancers. *Int J Biochem Mol Biol.* 2011; 2 (1): 89 - 98.

Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci.* 2007 Aug; 334 (2): 115 - 24.

Yoneda K, Yamamoto T, Osaki T. p53- and p21-independent apoptosis of squamous cell carcinoma cells induced by 5-fluorouracil and radiation. *Oral Oncol.* 1998 Nov; 34 (6): 529 - 37.

Yue QX, Liu X, Guo DA. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med.* 2010 Aug; 76 (11): 1037 - 43.

Zamble DB, Lippard SJ. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci.* 1995 Oct; 20 (10): 435 - 39.

Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, Melo DR, Alberici LC, Oliveira HC, et al. Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. *Lab Invest.* 2011 Feb; 91 (2): 232 – 40.

Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ES. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2005 Nov; 4 (11): 1686 - 696.

Zhao L, Wientjes MG, Au JL. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 1; 10 (23): 7994 - 8004.

Zoli W, Ulivi P, Tesei A, Fabbri F, Rosetti M, Maltoni R, et al. Addition of 5-fluorouracil to doxorubicin-paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research.* 2005, 7: 681 - 89.

ANEXO



CEUA/Unicamp

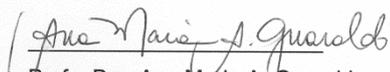
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

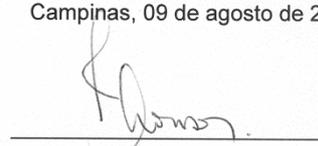
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo dos efeitos da terapia combinada Orlistat/Cisplatina sobre o processo metastático em modelo ortotópico de carcinoma de células escamosas de língua" (protocolo nº 2791-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edgard Graner / Fernanda dos Santos Moreira, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 09 de agosto de 2012.

Campinas, 09 de agosto de 2012.


Profª. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>