



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



Karina Giovanetti

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRICLOSAN EM LINHAGENS
CELULARES DE CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL**

**Piracicaba
2010**

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

Karina Giovanetti

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRICLOSAN EM LINHAGENS
CELULARES DE CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL**

*Monografia apresentada ao Curso de Odontologia
da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Cirurgião-Dentista.*

Orientador: Prof. Dr. Jacks Jorge Junior

**Piracicaba
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

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

G439e Giovanetti, Karina.
Efeitos do triclosan em linhagens de células de carcinoma
espinoceular da cavidade bucal / Karina Giovanetti. --
Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.
39f. : il.

Orientador: Jacks Jorge Junior.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Patologia bucal. 2. Ácidos Graxos. I. Jorge Junior,
Jacks. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Ivanilde e Carlos**, as minhas avós, **Lazara e Angelina**, e ao meu avô, **Acácio**, pessoas determinantes para a realização e conclusão de mais essa etapa da minha vida.*

Agradecimentos

À **Deus**, primeiramente, pela força e coragem durante toda esta caminhada e por sempre guiar meus passos;

Aos meus pais, **Ivanilde e Carlos**, que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial, pois sem eles jamais alcançaria os meus objetivos;

Às minhas avós e ao meu avô, dos quais me orgulho muito e que sempre me apoiaram:

Aos meus tios e primos, que sempre estiveram ao meu lado, participando dessa etapa da minha vida;

À minha irmã e amiga fiel, **Larissa**, que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, e que foi e sempre será meu porto seguro. Obrigada pelo companheirismo e paciência nas horas em que eu mais precisei;

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**, pela dedicação a mim dispensada na realização desse trabalho, pelos inúmeros conselhos e ensinamentos e com quem tive o imenso prazer em trabalhar, assim como a oportunidade de estagiar no Orocentro, durante a minha graduação;

Ao **Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line** pela dedicação e eficiência como orientador e também por me ensinar na minha primeira iniciação científica;

À aluna de pós- graduação, **Ana Terezinha Marques Mesquita**, pela paciência e dedicação pelo meu projeto de iniciação;

Aos colegas de turma, com quem passei quatro anos da minha vida, compartilhado os momentos difíceis, mas também os bons e que sem dúvidas ficarão gravados eternamente na minha memória;

A todos os professores, pela dedicação e importantes ensinamentos para a minha formação;

A todos os funcionários da FOP – UNICAMP, que nos recebem sempre com sorriso e fazem com que seja possível o andamento de todos os trabalhos realizados nesta faculdade.

Resumo *

A enzima FASN encontra-se altamente expressa em neoplasias malignas, na qual é responsável pela síntese de ácido graxo, sendo importante para a sobrevivência das células malignas. O triclosan, tem sido considerado como possível agente quimioterapêutico devido apresentar ação inibidora da enzima FASN. Sendo assim, este estudo teve como principal objetivo analisar os efeitos do triclosan sobre as células SCC-9 derivadas de CECs bucais humanos em relação aos índices de proliferação, apoptose e expressão das proteínas FASN, ErbB2, p27^{Kip1} e Skp2. O triclosan reduziu em 80% a quantidade de células na fase S do ciclo celular e aumentou as taxas de apoptose, quando as células foram tratadas com 5 µM e 10 µM, principalmente no período de 48 horas, o que foi demonstrado nos ensaios de citometria de fluxo. Experimentos de western blotting revelaram diminuição de ErbB2 e Skp2 e aumento gradativo de p27^{Kip1} nas células tratadas por 24 horas. Este estudo sugere que o triclosan pode ser mais uma alternativa quimiopreventiva e/ou quimioterapêutica para os CECs bucais humanos.

Palavras-chave: Carcinoma Espinocelular; Ácido graxo sintase; Triclosan.

*** Este Trabalho de Conclusão de Curso é parte da tese da aluna Ana Terezinha Marques Mesquita, que co-orientou este trabalho.**

Abstract

The enzyme FASN is highly expressed in malignant neoplasms, which is responsible for the synthesis of fatty acid, important for survival of malign cells. Triclosan have been considered which possible chemotherapeutic agent because it has inhibitory action on the enzyme FASN. So, this study evaluated the rates of proliferation, apoptosis and protein expression of FASN, ErbB2, Skp2 and p27^{Kip1} by SCC-9 cells derived from human oral SCCs. Triclosan reduced by 80% the amount of cells in S phase of cell cycle and increased apoptosis when cells were treated with 5 μ M and 10 μ M, especially during the 48 hours demonstrated in the flow cytometry. Also there was a decrease in ErbB2 and Skp2 and p27^{Kip1} gradual increase in cells treated for 24 hours analyzed in western blotting assays. This study suggests with the triclosan can be more a chemopreventive and/or chemotherapeutic alternative for human oral SCCs.

Keywords: Squamous cell carcinoma; Fatty acid synthase; Triclosan.

Sumário

1	Introdução	8
2	Revisão da Literatura	9
2.1	Carcinoma Espinocelular da cavidade bucal (Carcinoma de Células Escamosas)	9
2.2	Ácido graxo sintase (FASN)	9
2.3	Triclosan	10
3	Proposição	13
4	Material e Métodos	14
4.1	Cultura de células	14
4.2	Preparo da solução de triclosan	15
4.3	Análise do ciclo celular	15
4.4	Análise da apoptose pela técnica da Anexina V	16
4.5	Preparação dos extratos protéicos das células SCC-9	16
4.6	Separação eletroforética de proteínas e western blotting	17
4.7	Coloração das células SCC-9 com Oil red-O para lipídios	18
4.8	Análise Estatística	19
5	Resultados	20
5.1	Análise do efeito do triclosan sobre o ciclo celular das células SCC-9	20
5.2	Avaliação do efeito do triclosan sobre a apoptose das células SCC-9	21
5.3	Efeito do tratamento com triclosan sobre a produção de FASN, ErbB2, p27 ^{kip1} e Skp2 pelas células SCC-9	23
5.4	Análise da quantidade de lipídios nas células SCC-9 tratadas com triclosan	24
6	Discussão	26
7	Conclusões	29
	Referências	30

1 Introdução

No Brasil, segundo o INCA o câncer bucal, uma doença crônica é considerado um problema de saúde pública, sendo uma das causas mais frequentes de morte. Isso ocorre, pois com o avanço tecnológico e a urbanização expõem a população a fatores de risco, como aditivos alimentares, níquel, poluição ambiental e tabagismo. Mesmo a boca sendo um local de fácil acesso para o exame físico ainda o câncer bucal está entre as dez localizações mais frequentes para a ocorrência dessa neoplasia maligna (Costa & Migliorati, 2001).

O triclosan (2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenil éter ou 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxifenol) é um agente antifúngico e antibacteriano, de amplo espectro, presente em cremes dentais, enxaguatórios bucais, desodorantes, sabonetes e cremes dermatológicos (Bhargava & Leonard, 1996). O mecanismo de ação antibiótica se faz pelo bloqueio da síntese de lipídios, através da inibição específica da enzima enoil-redutase (ENR) (McMurry *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 1999). Esta enzima catalisa a redução de uma ligação dupla carbono-carbono NADH-dependente, em uma das fases de síntese da ácido graxo sintase (FASN) (Stewart *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 1999).

A enzima FASN é a principal responsável pela síntese de ácidos graxos endógenos em células normais. Recentemente, vários estudos têm demonstrado níveis elevados desta enzima em diferentes neoplasias malignas, como carcinomas de mama (Pizer *et al.*, 1996), próstata (Epstein *et al.*, 1995; Swinnen *et al.*, 1996), ovário (Alo *et al.*, 2000), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), bexiga (Visca *et al.*, 2003), pele como o melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003) e carcinomas espinocelulares bucais (CECs) (Krontiras *et al.*, 1999; Agostini *et al.*, 2004). Guo *et al.*, 2003 demonstraram que a inibição da enzima FASN por inibidores específicos como a cerulina reduziu a síntese de ácidos graxos em CECs bucais e Liu *et al.*, 2002 ao analisarem a inibição da enzima FASN utilizando o triclosan verificaram a redução da síntese de ácidos graxos em carcinomas de mama, sugerindo um papel quimioterápico do triclosan.

Este trabalho realizou uma análise inédita dos efeitos do triclosan em linhagens celulares de carcinomas espinocelulares de boca e ainda verificou a possibilidade de sua aplicação na quimioprevenção e ou tratamento destas neoplasias.

2 Revisão da Literatura

2.1 Carcinoma Espinocelular da cavidade bucal (Carcinoma de Células Escamosas)

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: pulmão, estômago, fígado, cólon e mama (INCA, 2010). O câncer bucal está entre as 10 neoplasias malignas mais comuns no mundo, representando cerca de 3% do total (Scully & Felix, 2006).

No Brasil as estimativas para os anos de 2010 e 2011 cerca de 14.120 novos casos de câncer de boca (INCA, 2010), o que corresponderá ao 5.º câncer mais comum em homens e o 7.º mais comum em mulheres. O Carcinoma Espinocelular (CEC) é considerado a neoplasia maligna mais comum em boca e orofaringe representando mais de 90% dos casos (Scully & Felix, 2006,OMS 2005b). Cerca de 75% dos carcinomas espinocelulares de boca atingem a região de assoalho bucal, língua e região retromolar; sendo a língua o local mais afetado (Kowalski *et al.*, 2002).

Trata-se de uma neoplasia agressiva e que freqüentemente pode promover metástase para linfonodos regionais. Frequentemente acomete pacientes adultos entre a 5ª e 6ª décadas de vida que apresentam histórico de uso abusivo de tabaco e bebidas alcoólicas. De maneira geral, os homens são mais afetados do que as mulheres. Isto acontece porque na maioria dos países o homem é quem faz uso do tabaco e álcool em grande quantidade. No entanto, na Índia, as mulheres apresentam um alto índice de câncer de boca devido ao hábito de mascar tabaco (OMS 2005b).

A taxa de sobrevivência de cinco anos para os pacientes portadores de CEC bucal está entre as mais baixas, quando comparadas com as de outras neoplasias malignas (Margotta & Capogreco, 2003), permanecendo inalterada durante as duas últimas décadas, mesmo com os progressos nos métodos terapêuticos e de diagnóstico que vêm ocorrendo na oncologia clínica (Miller *et al.*, 2003).

2.2 Ácido graxo sintase (FASN)

Estruturalmente, a FASN é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas longas, com massa molecular de aproximadamente 250 Kda. Em cada cadeia existem sete sítios catalíticos distintos e um sítio para a proteína carregadora de acil (ACP) (Stoops & Wakil, 1981). O sítio tioesterase localizado na região carboxil-

terminal promove a hidrólise do palmitato, o qual é liberado como molécula de ácido graxo recém-sintetizado (Wakil, 1989).

Mendes *et al.* (1953), demonstraram pela primeira vez, aumento na síntese de ácidos graxos pelos tecidos tumorais. O primeiro estudo sobre a expressão de FASN em CECs bucais foi realizado por Krontiras *et al.* (1999). Para isso, os pesquisadores realizaram análise imunohistoquímica em 56 casos de CECs de língua humanos. A expressão de FASN foi detectada em 98% das amostras avaliadas, com variação na quantidade de enzima na lesão e em áreas distantes da neoplasia.

A cerulenina e o C75, inibidores da atividade de FASN, produzem rápida e significativa inibição da replicação do DNA e, conseqüentemente bloqueiam a progressão da fase S em células derivadas de neoplasias malignas humanas, culminando com a morte celular por apoptose (Li *et al.*, 2001). Linhagens celulares de CECs bucais, com expressão de FASN, quando submetidas ao tratamento com cerulenina adicionada ao meio de cultura, mostraram redução significativa na proliferação celular (Agostini *et al.*, 2004), sendo assim a FANS alvo para o tratamento de neoplasias malignas.

2.3 Triclosan

O triclosan é um agente antimicrobiano sintético, não-iônico, de amplo espectro principalmente de ação antibacteriana, mas também com algumas propriedades antifúngicas e antivirais (Jones *et al.*, 2000). É um bifenóis clorados (FIGURA 1), insolúvel em água. Em baixas concentrações, destroem a parede celular, pois inibem as enzimas responsáveis pela fabricação e manutenção, o que gera a morte celular (Bhargava & Leonard, 1996).

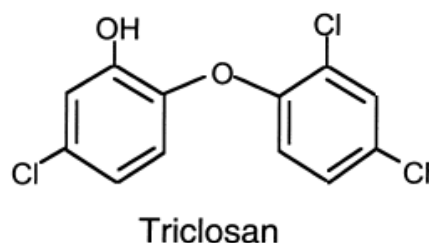


Figura 1: Fórmula química do triclosan.

A determinação da estrutura cristal do complexo *E.coli* FabI-NAD⁺-triclosan confirmou que o triclosan forma um complexo ternário estável por interagir com aminoácidos do sítio ativo da enzima. Ele age como inibidor da enoil-redutase, mimetizando seu substrato natural (FIGURA 2) (Stewart *et al.*, 1999) que foi

comprovado pelos estudos com diferentes bactérias que o triclosan age na via biossintética de ácidos graxos das bactérias.

O triclosan a 1000 p.p.m quando administrado na dieta de ratas, em modelos experimentais de carcinogênese mamária induzida, produziu uma redução significativa na incidência de tumores mamários (43,3% no grupo tratado *versus* 70% no grupo controle).

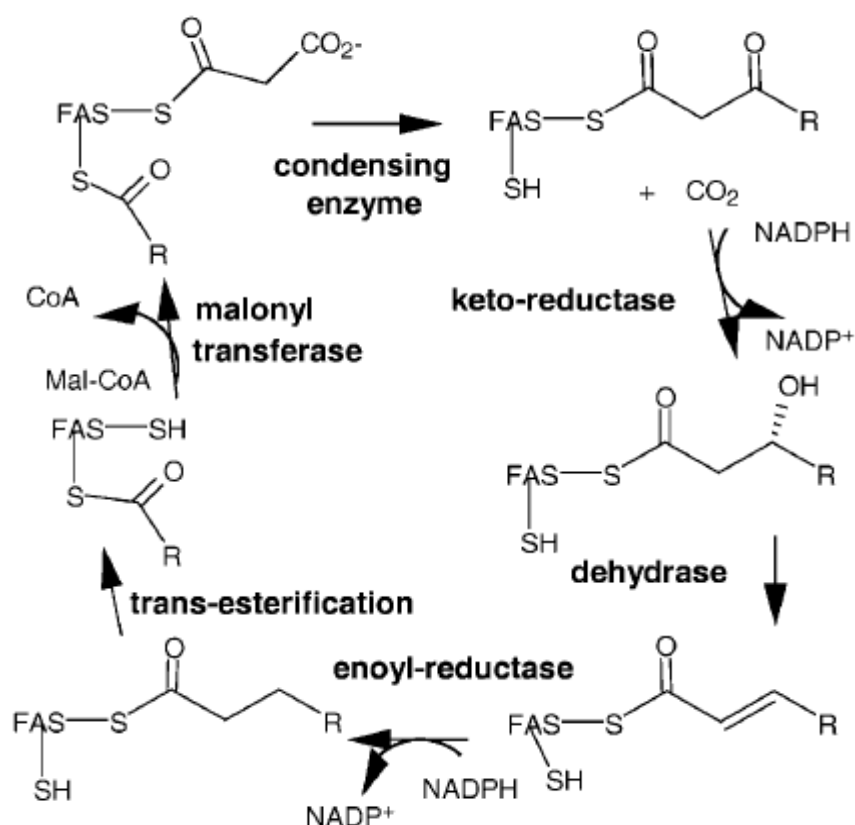


Figura 2: Esquema da síntese de ácidos graxos (Liu *et al.*, 2002).

Existem trabalhos publicados na literatura que mostram a ação inibidora do triclosan sobre a FASN (Stewart *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 1999; McMurry *et al.*, 1998). Tem sido proposto que a FASN é um alvo quimioterapêutico no tratamento de alguns tipos de cânceres tais como: mama, próstata e CECs bucais (Liu *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003).

Considerando que o triclosan é um inibidor de FASN e que essa inibição interfere no crescimento tumoral, faz-se necessário investigar o efeito desta substância sobre linhagens de células de CECs bucais, com a finalidade de determinar se a mesma tem algum potencial na prevenção e/ou tratamento destes tipos de tumores.

3 Proposição

Objetivo geral

Avaliar a influência do triclosan na resposta celular da linhagem de células de CEC bucal humano.

Objetivos específicos

1. Avaliar através de citometria de fluxo a apoptose e proliferação celular das células SCC-9 tratadas com triclosan;
2. Verificar os efeitos do triclosan sobre os níveis de produção das proteínas FASN, ErbB2, p27^{Kip1} e Skp2 pela linhagem SCC-9 através de ensaios de western blotting.

4 Materiais e Métodos

4.1 Cultura de células

- A linhagem celular SCC-9 (CRL-1629) proveniente de CEC bucal humano, obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC, E.U.A.) foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (NUNC, E.U.A.) sendo esta linhagem SCC-9 mantida em meio de cultura DMEM/F-12 (Invitrogen, E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Brasil), 400 ng/ml de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona – Eurofarma, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen, E.U.A.) na diluição de 1:100;
- Estas células SCC-9 foram incubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade e então subcultivadas quando atingiam uma confluência aproximada de 60-70% removendo-se o meio de cultura e lavando-as com 5 ml ou 10 ml de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e depois incubadas a 37 °C com 0,5 ml ou 2 ml de tripsina a 2%;
- Após período de aproximadamente 8 minutos as células SCC-9 ficavam separadas do assoalho dos frascos de cultura, sendo a ação da tripsina interrompida pela adição de 5 ml ou 10 ml de meio de cultura com 10% de FBS, sendo então transferida a suspensão contendo as células para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning, E.U.A.) e estes centrifugados a 800 xg por 3 minutos;
- Após a remoção e descarte do sobrenadante, o *pellet* de células era ressuscitado em 5 ml de meio de cultura com 10% de FBS, as células contadas e replaqueadas em novos frascos de 25 ou 75 cm². O meio de cultura foi trocado a cada 48 h;
- Foram congeladas várias amostras de cada linhagem celular antes da realização dos experimentos e subcultivadas no máximo por dez passagens e então descartadas;
- O triclosan foi adicionado ao meio de cultura em concentrações de 5 µM e 10 µM para bloqueio da FASN, sendo nos controles utilizado volume de DMSO da concentração de 10 µM. Todas as soluções

foram filtradas (Filter Corning 0,20 μm , Alemanha) antes de serem colocadas nos poços de cultura.

4.2 Preparo da solução de triclosan

- Diluição do triclosan em DMSO (Liu *et al.*, 2002) em temperatura ambiente sob agitação por 10 minutos;
- Estoque de 5 ml da solução na concentração de 10 mg/ml (50 mg de triclosan diluídos em 5 ml de DMSO) em 4 °C, por no máximo um mês, para evitar a diminuição da sua concentração e/ou atividade por formação de produtos de degradação.

4.3 Análise do ciclo celular

- Foram plaqueadas 3×10^5 células SCC-9 (análises de 24 horas) e 2×10^6 células (48 horas), em frascos de iguais com meio DMEM/F-12 com 10% de FBS;
- Após 24 h, o meio foi substituído por DMEM/F-12 livre de FBS e as células incubadas por mais 24 h;
- Os frascos de tratamento receberam triclosan a 5 μM e 10 μM e DMSO no controle, ambos com 10% de FBS;
- Após 24 e 48 h, as células foram coletadas, fixadas com etanol a 70% gelado, colocadas a -20 °C por 12 h, lavadas em PBS gelado e tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de RNase (Sigma-Aldrich) a 37 °C durante 1 h;
- Depois as células foram coradas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo a 4 °C por 2 h. A distribuição das células no ciclo celular foi analisada utilizando-se o software CellQuest (Becton Dickinson) em um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipado com laser de argônio. Para cada amostra foram analisados dez mil eventos.

4.4 Análise da apoptose pela técnica da Anexina V

- Foram plaqueadas semelhante ao ensaio anterior inclusive os tempos;
- Nos períodos de 24 e 48 h de tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas em PBS e incubadas com Anexina V-FITC (1:500, Invitrogen) em 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, no escuro, por 20 minutos à temperatura ambiente;
- Através da citometria de fluxo observamos as células positivas para Anexina V-FITC, ou seja que sofreram apoptose. Para cada amostra foram analisados dez mil eventos.

4.5 Preparação dos extratos protéicos das células SCC-9

- As proteínas foram extraídas em um tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton-X, 20 mM de Tris pH 8,0, 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA e 1 mM de NaF, acrescentando-se inibidores de proteinase ao tampão de lise imediatamente antes do uso;
- Cem microlitros deste tampão foram colocados sobre os *pellets* celulares, os quais foram dissociados por pipetagem e mantidos no gelo por 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Em seguida, foi realizada centrifugação e os sobrenadantes coletados, sendo separadas alíquotas de 5 µl de cada extrato para quantificação protéica;
- Todos os extratos protéicos foram imediatamente congelados até o momento do uso. A quantidade de proteína total dos extratos protéicos foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando-se o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e um espectrofotômetro (Spectronic Genesys 2).

4.6 Separação eletroforética de proteínas e western blotting

- Quantidades iguais de proteínas de cada extrato celular foram misturadas com um tampão de amostra redutor 4 vezes concentrado, fervidas por 5 minutos e separadas eletroforeticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 8% ou 12% em tampão de corrida;
- As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Invitrogen) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl pH 8,0, 9,6 mM de glicina e 20% metanol, por um período de quatro horas e trinta minutos. Todas as membranas foram coradas com o corante *Ponceau S* (Sigma-Aldrich) para verificar a eficácia da transferência;
- As membranas foram bloqueadas por 16 h à 4 °C em uma solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20 (TBST). A incubação das membranas com os anticorpos primários (Tabela 1), diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado, foi feita por 2 h à temperatura ambiente. Os anticorpos contra a proteína do citoesqueleto β -actina foram usados como controle da quantidade de proteína aplicada em cada canaleta;

Tabela 1. Relação dos anticorpos primários utilizados nas reações de western blotting.

Anticorpos	Clone	Fabricante	Diluição
FASN	23	BD Transduction Laboratories	1:3.000
ErbB2	AO485	DAKO	1:1.000
p27 ^{Kip1}	G173-524	BD Transduction Laboratories	1:500
Skp2	sc-7164	Santa Cruz	1:1.000
β -actina	AC-15	Sigma-Aldrich	1:60.000

- As membranas foram lavadas com TBST por quatro vezes durante 15 minutos cada, seguidas de incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase na diluição de 1:1000, por 1 h à temperatura

ambiente, seguida de quatro lavagens de 15 minutos cada com TBST. As reações foram reveladas por meio de quimioluminescência, utilizando-se o kit de detecção ECL – Amersham ECL Western Blotting, e expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, E.U.A.);

- Os resultados foram quantificados por análise densitométrica, realizada com o auxílio de um densitômetro modelo GS-700 (Bio Rad, E.U.A.) e do programa Molecular Analyst (Bio Rad).

4.7 Coloração das células SCC-9 com Oil red-O para lipídios

- O Oil red-O (1-([4-(Xililazo)xilil]azo)-2-naftol, $C_{26}H_{24}N_4O$; Sigma-Aldrich) foi dissolvido em álcool isopropílico sendo 0,350g do corante adicionado em 100ml do solvente e esta solução armazenada à temperatura ambiente *overnight*;
- Após a filtragem da solução com filtros de papel (Whatman[®] #4, Reino Unido), foram adicionados 36 ml de água destilada e esperou-se 16 h em uma temperatura de 4 °C seguido de uma nova filtragem;
- Repetiu-se o processo de filtragem sempre antes do uso e a solução foi armazenada em temperatura ambiente (Ramírez-Zacarias *et al.*, 1992; Kinkel *et al.*, 2004);
- Foram preparados dois poços (Lab Tek, Biosciences, E.U.A.) de lâmina para cultura celular onde foram plaqueadas 5×10^4 células SCC-9 em 2 ml de meio DMEM/F-12 com 10% de FBS em cada, sendo um para as células tratadas (triclosan) e outro para as células controle (DMSO);
- Depois de 24 h o meio foi trocado por meio livre de FBS e as células foram incubadas por 48 h;
- Foram obtidas três soluções onde 5 μ M de triclosan e DMSO foram adicionadas em meios com 10% de FBS, 2% de FBS e meio livre de FBS, distribuídas em três lâminas incubadas durante 48 h.
- A técnica de coloração com Oil red-O já relatada (Ramírez-Zacarias *et al.*, 1992, Kinkel *et al.*, 2004), foi modificada com a remoção do meio de cultura, lavagem das células com PBS e fixação com solução de formaldeído a 10% (10 min) à temperatura ambiente;

- As células localizadas em cada poço, foram coradas por 2 horas à temperatura ambiente colocando-se 1 ml de Oil red-O após ser feita a lavagem com água destilada por aproximadamente 1 minuto
- Foi feita a remoção do corante das células e estas foram lavadas com água destilada e contra-coradas com hematoxilina de Carazzi (nuclear) por 1 minuto. As células foram então lavadas com água de torneira (até que a água se tornasse límpida), armazenadas para secagem em temperatura ambiente e as lâminas montadas com meio aquoso (Aquatex, Merck, Alemanha);
- A quantificação dos corpúsculos lipídicos foi feita utilizando-se o sistema Kontron 400 (Kontron System 400 versão 2.0, Carl Zeiss, Alemanha), Para cada célula foi feita a média aritmética dos números de corpúsculos lipídicos.

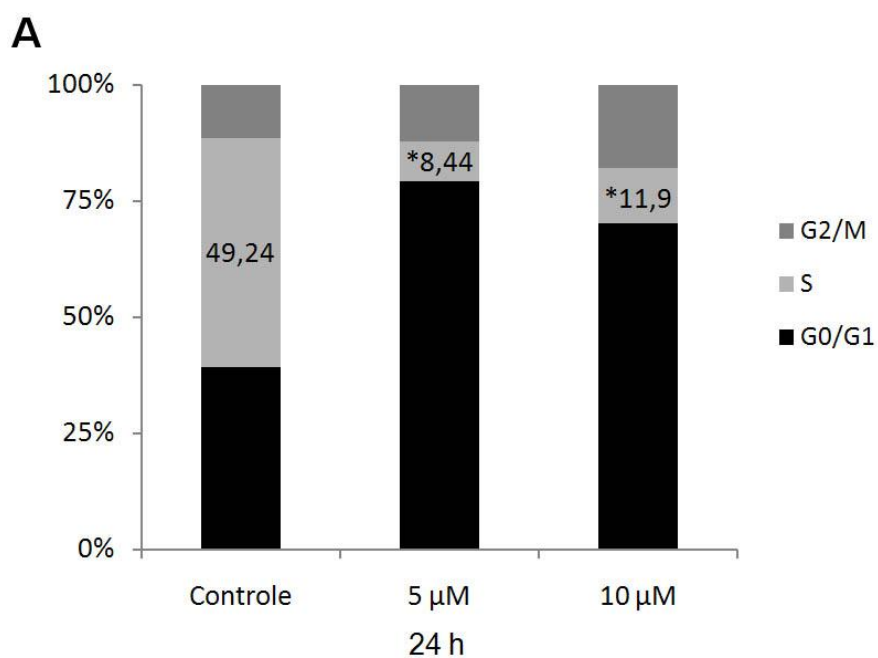
4.8 Análise Estatística

Utilizamos o programa Excel (Microsoft, E.U.A). A significância estatística dos resultados foi verificada através da análise de variância não-paramétrica do teste *t* de Student, sendo considerado significativo o índice de 5% ($p = 0,05$).

5 Resultados

5.1 Análise do efeito do triclosan sobre o ciclo celular das células SCC-9

O tratamento com 5 μM e 10 μM de triclosan por 24 h e 48 h mostrou a inibição da progressão do ciclo celular, ocorrendo um aumento da quantidade de células na fase G0/G1 e redução de 80% na fase S. (FIGURA 3).



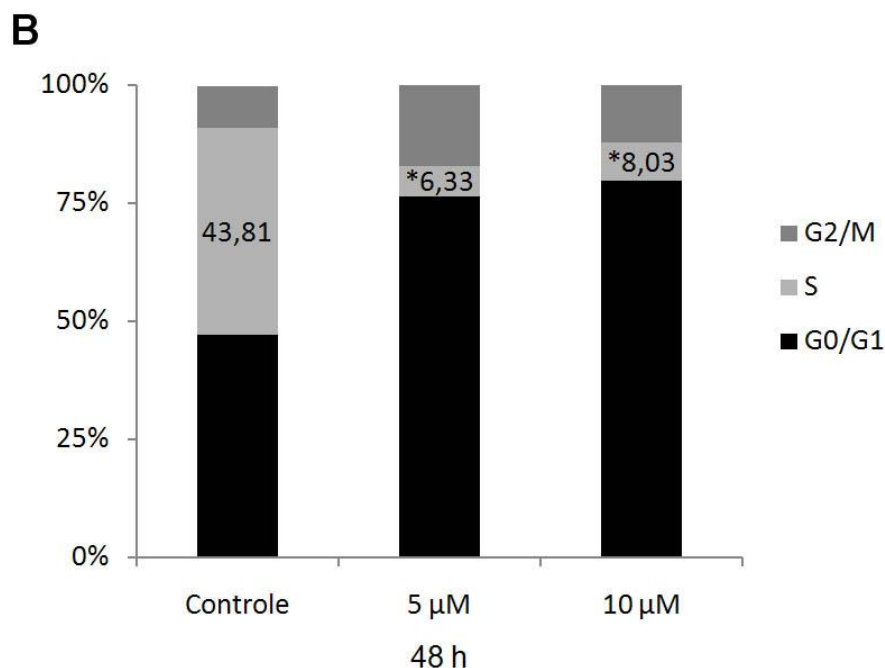


Figura 3. Distribuição das células SCC-9 nas fases do ciclo celular, após tratamento com 5 µM ou 10 µM de triclosan. Nota-se que houve um aumento na porcentagem de células nas fases G0/G1, concomitante com uma diminuição de 80% na fase S em ambas as concentrações, tanto no período de 24 h (A) como 48 h de tratamento (B). Valores médios obtidos de três experimentos independentes (* $p < 0,05$; teste t de Student).

5.2 Avaliação do efeito do triclosan sobre a apoptose das células SCC-9

A apoptose aumentou uma vez (15%) e duas vezes (122%) nas células tratadas com 5 µM e 10 µM de triclosan, respectivamente, após 24 h quando comparadas às células controles. No período de 48 h as taxas de apoptose foram maiores ainda, sendo sete vezes maior (625%) em relação aos controles (FIGURA 4). Em relação a morfologia, foi observado que as células SCC-9 apresentaram aspecto mais arredondado e em menor quantidade quando comparadas comparação às controle (FIGURA 5).

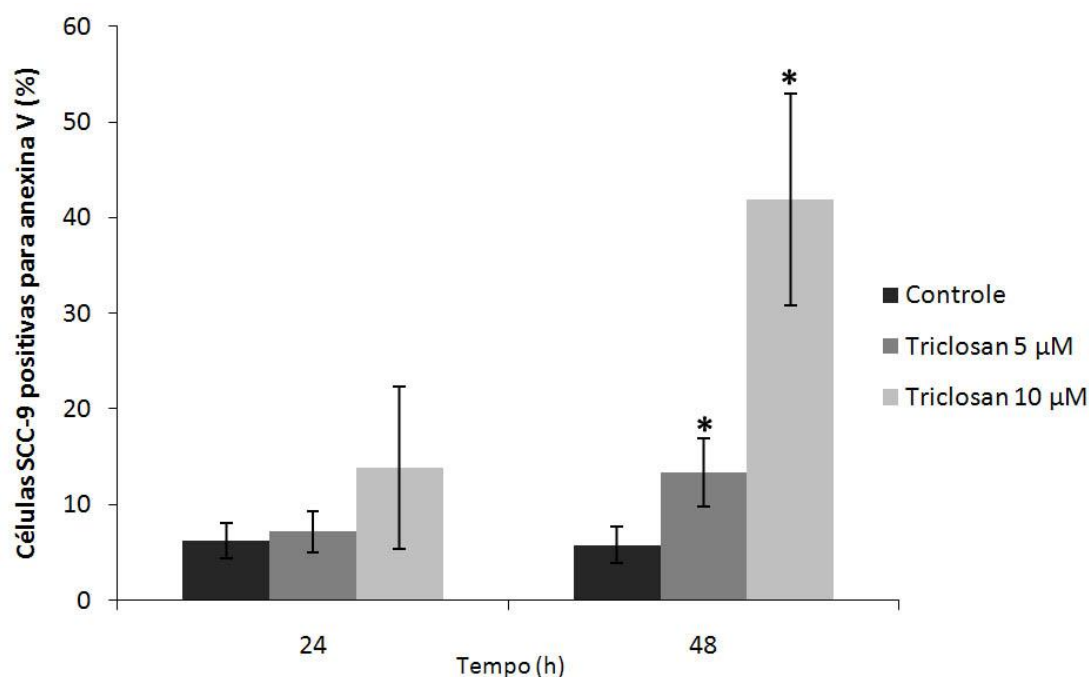


Figura 4. A porcentagem de células apoptóticas após o tratamento com triclosan foi avaliada pela marcação com Anexina-V FITC em citômetro de fluxo. Nota-se que após 48 h, os índices de apoptose aumentaram duas vezes (132%) nas células tratadas com 5 μM e sete vezes (625%) nas células tratadas com 10 μM de triclosan (* $p < 0,05$; teste t de Student).

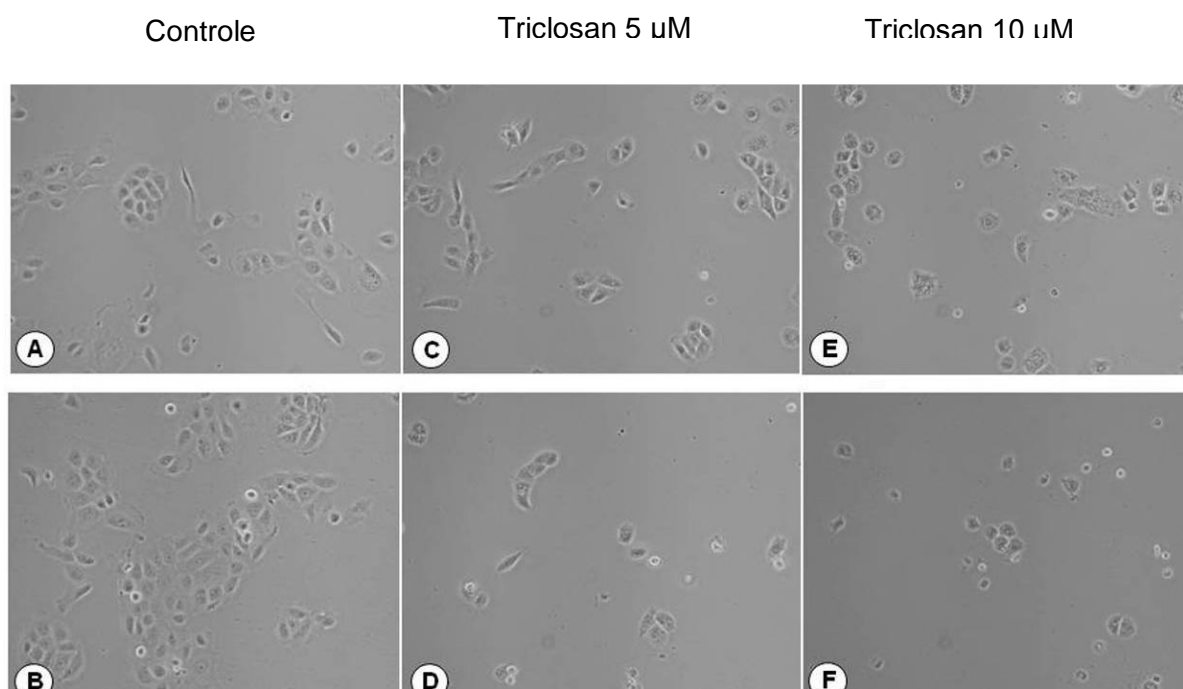
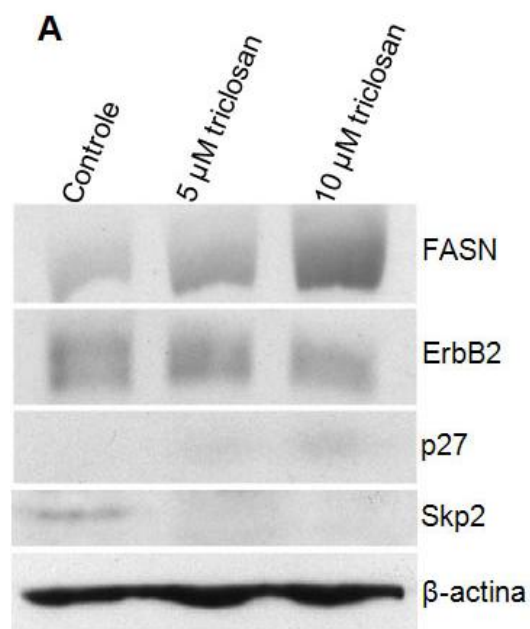


Figura 5. Aspecto morfológico das células SCC-9 controle e após tratamento com diferentes concentrações de triclosan por 24 h e 48 h. (A) Células controle (DMSO), após 24 h e (B) 48 h, exibindo crescimento em grumos e apresentando maior densidade. As células tratadas com 5 μM de triclosan por 24 h (C) e 48 h (D), e com 10 μM de triclosan nos períodos de 24 h (E) e 48 h (F) apresentaram menor densidade e formato mais arredondado (Microscopia de contraste de fase, aumento original 100X).

5.3 Efeito do tratamento com triclosan sobre a produção de FASN, ErbB2, p27^{kip1} e Skp2 pelas células SCC-9

A linhagem de células SCC-9 quando tratada com Triclosan na concentração de 5 μ M e 10 μ M por 24 h e 48 h apresentou aumento da quantidade de FASN, em relação às células controle. Na concentração de 10 μ M de triclosan houve redução de ErbB2 e Skp2 e aumento de p27^{kip1} indicando parada do ciclo celular, o que também foi demonstrado na citometria de fluxo (FIGURA 6A). A Figura 6B mostra a análise densitométrica das bandas correspondentes às proteínas analisadas na Figura 6A.



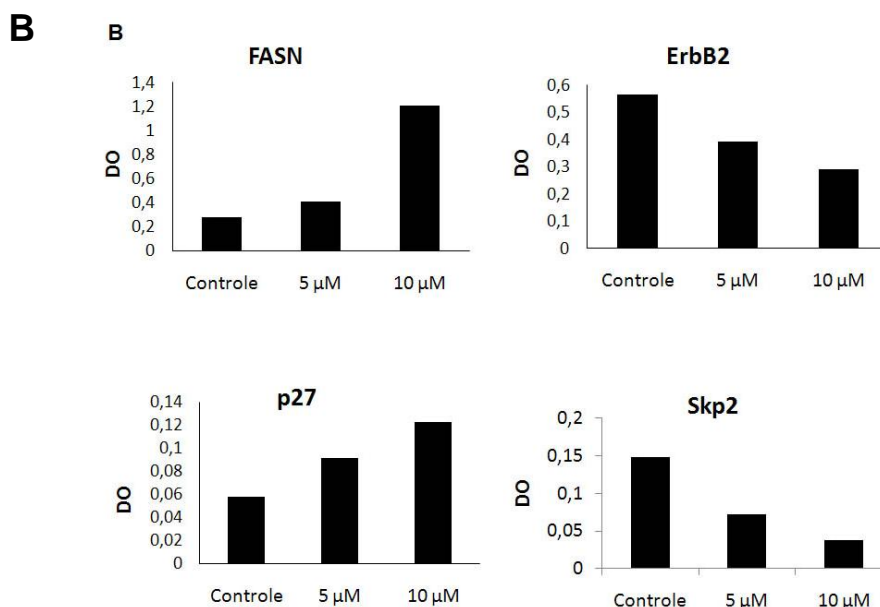


Figura 6 (A). Experimentos de western blotting que representam o efeito do tratamento com triclosan sobre a quantidade das proteínas FASN, ErbB2, p27^{kip1} e Skp2, nas células SCC-9. Nota-se maior intensidade da banda de FASN, nas células tratadas com 10 µM de triclosan; discreta redução na intensidade da banda de ErbB2 com 10 µM de triclosan; aumento gradativo na intensidade da banda de p27^{kip1} e diminuição de Skp2. A detecção da proteína de citoesqueleto β -actina mostra que todas as canaletas receberam a mesma quantidade de proteína total. **(B)** Análise densitométrica das bandas mostradas em **A**.

5.4 Análise da quantidade de lipídios nas células SCC-9 tratadas com triclosan

A coloração com Oil red-O revelou que as células tratadas com triclosan apresentaram maior número de corpúsculos lipídicos quando comparadas com as células controles, correspondendo a 57,48% e 16,67% respectivamente (FIGURAS 7A e B). Para investigar a influência dos ácidos graxos presentes no meio de cultura, foram realizados experimentos em que as células foram cultivadas em meio contendo menor concentração de FBS, ou seja, 2% e em meio livre de FBS. A redução do número de corpúsculos lipídicos foi observada tanto nas células tratadas com triclosan como nas controles, porém as células tratadas ainda apresentaram maior número destes corpúsculos (FIGURA 7C).

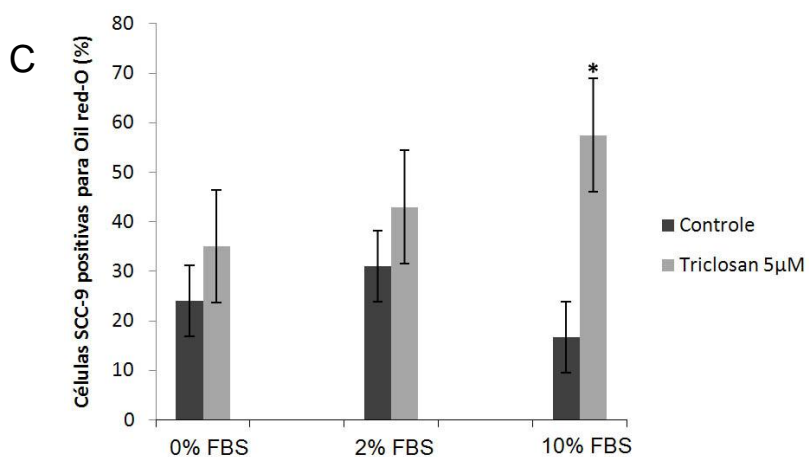
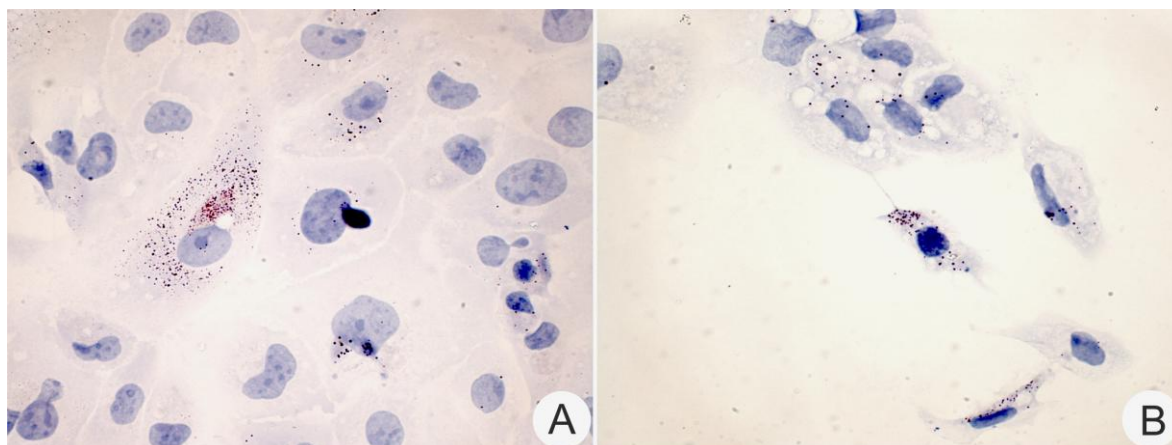


Figura 7. Coloração para lipídios com Oil red-O nas células SCC-9 controle e tratadas com 5 μM de triclosan durante 24 h em meio contendo 10% de FBS. (A) Controle (DMSO), mostrando algumas células com grande quantidade de corpúsculos lipídicos e outras negativas (aumento original 200X). (B) Presença de corpúsculos lipídicos na maioria das células tratadas com triclosan. (C) Gráfico representativo da marcação com Oil red-O em diferentes concentrações de FBS, mostrando maior positividade nas células submetidas ao tratamento com triclosan (* $p = 0,002$; teste t de Student).

6 Discussão

A enzima FASN controla a iniciação e progressão de diversos tumores, sendo alvo em potencial para o tratamento do câncer (Flavin *et al.*, 2010). Tem sido demonstrado aumento da expressão de FASN também nos CECs bucais (Alo *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008). Inibidores específicos da atividade de FASN reduzem a proliferação e causam apoptose em células malignas e reduzem o crescimento tumoral em modelos xenográficos de câncer de próstata, mama, estômago, intestino, pulmão, ovário, melanoma e cavidade bucal (Pizer *et al.*, 1996a; Pizer *et al.*, 1996b; Krontiras *et al.*, 1999; Innocenzi *et al.*, 2003; Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Orita *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Puig *et al.*, 2009). Seguin (2009) mostrou que a inibição de FASN pelo Orlistat reduziu a angiogênese e o volume dos linfonodos metastáticos em modelo murino de melanoma, assim como a proliferação de células endoteliais da linhagem RAEC (derivada da aorta de coelhos).

O antimicrobiano triclosan, tem ação antibiótica por inibir a enzima FASN através da inativação do domínio enoil-redutase (McMurry *et al.*, 1998). Existem apenas dois estudos que avaliaram a ação antitumorigênica do triclosan correlacionada com seu mecanismo de inibição da enzima FASN. A maioria dos estudos avaliou sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória (Kanetoshi *et al.*, 1988). Neste estudo foi demonstrado que o triclosan causa a paralisação do ciclo celular e aumento das taxas de apoptose em linhagem de células de CECs bucais. A escolha da linhagem SCC-9 para os experimentos *in vitro* foi baseada no estudo de Agostini *et al.* (2004) que demonstraram maiores quantidades tanto de RNAs mensageiros como da proteína FASN em comparação com as células SCC-4, -15 e -25. Além do mais, tem sido descrito que a sensibilidade das células aos inibidores de FASN parece ser diretamente proporcional aos níveis de produção desta proteína (Grunt *et al.*, 2009; Puig *et al.*, 2009).

Quando tratadas com triclosan, a linhagem SCC-9 apresentou diminuição de 80% de células na fase S. O triclosan na concentração de 10 μ M no meio de cultura das células SCC-9 durante 48 h, causou aumento das taxas de apoptose, efeito semelhante a outros inibidores de FASN tais como a cerulenina e Orlistat (REF????). As células tratadas com triclosan apresentaram aumento dos níveis da proteína p27^{Kip1} e redução dos níveis de Skp2, indicando bloqueio do ciclo celular. Em relação à proteína ErbB2, houve redução nos extratos protéicos preparados a partir de células SCC-9 tratadas com

10 μ M de triclosan. Outros estudos também demonstraram redução de ErbB2 em células de câncer de mama e ovário quando tratadas com Orlistat e C75 (Menendez *et al.*, 2004; Grunt *et al.*, 2009), o que confirma a existência de uma interação molecular entre ErbB2 e FASN, proposta inicialmente por Kumar-Sinha *et al.* (2003)

O tratamento das células SCC-9 com triclosan provocou um aumento nos níveis da proteína FASN em relação às células controle incubadas somente com DMSO, o que também foi demonstrado por Carvalho *et al.*, (2008) em células B16F10 tratadas com Orlistat, e Puig *et al.*, (2009) em células de câncer de mama (SK-Br3) tratadas com compostos polifenólicos, um novo grupo de inibidores sintéticos de FASN. Outros estudos com diferentes linhagens celulares também demonstraram aumento dos níveis da FASN em resposta aos seus inibidores. Seguin (2009) observou que o tratamento de melanomas murinos com Orlistat não modificou a expressão de RNAs mensageiros para FASN, o que também está de acordo com Browne *et al.* (2006) que mostraram inibição de FASN pelo Orlistat em células endoteliais (HUVEC) sem alterações na produção desta enzima. Isto pode ser explicado pelo fato de que, em algumas linhagens celulares, a falta de atividade da enzima FASN pode gerar como resposta aumento na sua transcrição ou mesmo a estabilização da proteína FASN com aumento da sua meia-vida (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Neste estudo a atividade da enzima FASN não foi avaliada, mas está programada para trabalhos subsequentes.

O acúmulo de lipídios pode estar associado a condições experimentais de hipóxia, em células cultivadas em alta confluência (Barba *et al.*, 2001) ou tratadas com agentes quimioterapêuticos (Delikatny *et al.*, 2002; Milkevitch *et al.*, 2005). Alguns autores sugeriram uma associação com apoptose (Bezabeh *et al.*, 2001), necrose (Barba *et al.*, 1999; Opstad *et al.*, 2008) e diminuição do crescimento celular (Delikatny *et al.*, 1996). A técnica de coloração com Oil red-O tem sido utilizada para identificar lipídios neutros intracelulares em neoplasias malignas (Swinnen *et al.*, 1996; Esquenet *et al.*, 1997; Milkevitch *et al.*, 2005; Delikatny *et al.*, 2002; Bozza *et al.*, 2010). Neste estudo, a coloração com Oil red-O nas células SCC-9 foi heterogênea, com algumas células tratadas ou controle intensamente coradas e outras sem nenhuma marcação. Curiosamente, foi observado um aumento do número de células marcadas com Oil red-O na presença do triclosan. O aumento dos corpúsculos lipídicos nas células tratadas com triclosan pode ser explicado pelo aumento da apoptose e diminuição do crescimento, processos resultantes dos efeitos citotóxicos de quimioterápicos conforme

descrito por Delikatny *et al.*, (2002) e do próprio triclosan, como demonstrado neste trabalho por citometria de fluxo.

Interessantemente, nós observamos um maior tamanho dos corpúsculos lipídicos nas células tratadas com triclosan, o que também foi descrito por outros autores em células de câncer de próstata, mama e ovário, em resposta aos agentes quimioterapêuticos (Caliaro *et al.*, 1994; Delikatny *et al.*, 2002; Milkevitch *et al.*, 2005). A significância desta observação é incerta (Milkevitch *et al.*, 2005). Quintero *et al.* (2007) sugeriram que durante o bloqueio da proliferação, o transporte de lipídios cessa e há fusão dos corpúsculos resultando na formação de corpúsculos lipídicos com maiores diâmetros. As células tumorais submetidas à ação de drogas, utilizam os lipídios presentes no meio de cultura contendo FBS aumentando seu acúmulo intracelular (Delikatny *et al.*, 2002). De acordo com estes autores foi observado que a diminuição dos corpúsculos lipídicos foi mais acentuada em meio de cultura livre de FBS. As alterações nos níveis de lipídios intracelulares nas células SCC-9 tratadas com triclosan, não podem ser relacionadas com a atividade da enzima FASN utilizando apenas a coloração com Oil red-O. Sendo assim, mais estudos são necessários para determinar se o acúmulo de lipídios intracelulares pode ou não ser relacionado com a atividade da enzima FASN.

Os efeitos da inibição de FASN pelo triclosan foram evidenciados no estudo *in vitro*. O triclosan causou inibição da proliferação e aumento significativo das taxas de apoptose das células SCC-9 derivadas de CECs bucais, o que reforça a ação antitumorigênica dos inibidores de FASN e sugere ação quimioterapêutica do triclosan para estes tipos de tumores.

7 Conclusões

1. A inibição de FASN pelo triclosan causou parada significativa do ciclo celular e aumentou as taxas de apoptose, FASN e p27^{Kip1} na linhagem celular SCC-9 derivadas de CEC bucal-humano, porém diminuiu as taxas de Skp2 e ErbB-2, sugerindo que o triclosan pode ser uma alternativa terapêutica para estes tumores.

2. As células SCC-9 tratadas com triclosan apresentaram menor quantidade de corpúsculo lipídicos em relação às células controle, o que pode sugerir alteração na lipogênese.

REFERÊNCIAS¹

- Agostini M, Silva SD, 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.
- Alo PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, Serpieri DE, Di Tondo U. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep.* 2000; 7(6):1383-8.
- Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer,* 1996; 77(3):474-82.
- Barba I, Cabañas ME, Arús C. The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res.* 1999; 59(8):1861-8.
- Barba I, Mann P, Cabañas ME, Arús C, Gasparovic C. Mobile lipid production after confluence and pH stress in perfused C6 cells. *NMR Biomed.* 2001; 14(1):33-40.
- Bezabeh T, Mowat MR, Jarolim L, Greenberg AH, Smith IC. Detection of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using ¹HNMR spectroscopy. *Cell Death Differ.* 2001; 8(3):219-24.
- Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control.* 1996; 24(3):209-18.
- Bozza PT, Viola JP. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010; 82(4-6):243-50.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; (72):448-54.
- Browne CD, Hindmarsh EJ, Smith JW. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J.* 2006; 20(12):2027-35.
- Caliaro MJ, Marmouget C, Guichard S, Mazars P, Valette A, Moisand A, *et al.* Response of four human ovarian carcinoma cell lines to all-trans retinoic acid: relationship with induction of differentiation and retinoic acid receptor expression. *Int J Cancer.* 1994; 56(5):743-8.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas nas normas do Internacional Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

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; 123(11):2557-65.

Costa EG, Migliorati CA. Câncer Bucal: Avaliação do tempo decorrente entre a detecção da lesão e o início do tratamento. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2001; 47(3):283-9.

Delikatny EJ, Roman SK, Hancock R, Jeitner TM, Lander CM, Rideout DC, *et al.* Tetraphenylphosphonium chloride induced MR-visible lipid accumulation in a malignant human breast cell line. *Int J Cancer*. 1996; 67(1):72-9.

Delikatny EJ, Cooper WA, Brammah S, Sathasivam N, Rideout DC. Nuclear magnetic resonance-visible lipids induced by cationic lipophilic chemotherapeutic agents are accompanied by increased lipid droplet formation and damaged mitochondria. *Cancer Res*. 2002; 62(5):1394-400.

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):81-6.

Esquenet M, Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Deneef C, Heyns W, Verhoeven G. Retinoids stimulate lipid synthesis and accumulation in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1997; 136(1):37-46.

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

Grunt TW, Wagner R, Grusch M, Berger W, Singer CF, Marian B. *et al.* Interaction between fatty acid synthase- and ErbB-systems in ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 385(3):454-9.

Guo CB, Cui NB, Yu GY, Liu DX, Meng SC, Song Q. Effects of cerulenin on the endogenous fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61(8):909-12.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>. Acessado em 28/12/2009.

Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2003; 30(1):23-8.

Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of the effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control*. 2000; 28(2):184-96.

Kanetoshi A, Ogawa H, Katsura E, Okui T, Kaneshima H. Disposition and excretion of Irgasan DP300 and its chlorinated derivatives in mice. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1988; 17(5):637-44.

Kinkel AD, Fernyhough ME, Helterline DL, Vierck JL, Oberg KS, Vance TJ, *et al*. Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology*. 2004; 46(1):49-56.

Kowalski LP, Anelli A, Salvajoli JV, Lopes LF. *Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia*. São Paulo: Âmbito Editores, 2^a edição; 2002.

Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; 21(4):325-9.

Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Eisher SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Research*. 2003; 63(1):132-9.

Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology*. 2002; 40(1):71-9.

Levy CW, Roujeinikova A, Sedelnikova S, Baker PJ, Stuitje AR, Slabas AR, Rice DW, Rafferty JB. Molecular basis of triclosan activity. *Nature* 1999; 398(1):383-4.

Li JN, Gorospe M, Cherst FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WH. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res*. 2001; 61(4):1493-9.

Liu B, Wang Y, Fillgrove KI, Anderson VE. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002; 49(3):187-93.

Margotta V, Capogreco M. Soft tissue pathologies of the oral cavity. *Minerva Stomatol*. 2003; 52(1-2):47-51.

McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 1998; 394(6):531-2.

Mendes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissues slices in vitro. *Cancer Research*, 1953; 13(1):27-9.

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

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*. 2004; 101(29):1075-20.

Milkevitch M, Shim H, Pilatus U, Pickup S, Wehrle JP, Samid D, *et al.* Increases in NMR-visible lipid and glycerophosphocholine during phenylbutyrate-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1734(1):1-12.

Miller CS, Henry RG, Rayens MK. Disparities in risk of and survival from oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(5):570-5.

World Healthy Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky. Ed: IARC Press, Lyon (2005). Oral cavity and oropharynx: 163-208.

Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. An investigation of human brain tumour lipids by high-resolution magic angle spinning 1H MRS and histological analysis. *NMR Biomed.* 2008; 21(7):677-85.

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; 14(8):2458-64.

Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda F Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1996a; 56(12):2745-7.

Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res.* 1996b; 56(6):1189-93.

Puig T, Turrado C, Benhamú B, Aguilar H, Relat J, Ortega-Gutiérrez S, *et al.* Novel Inhibitors of Fatty Acid Synthase with Anticancer Activity. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(24):7608-15.

Quintero M, Cabañas ME, Arús C. A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1771(1):31-44.

Ramírez-Zacarias JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmatic lipids with Oil red O. *Histochemistry,* 1992; 97(6):493-7.

Seguin F. Estudo do papel biológico da enzima ácido graxo sintase (FASN) na angiogênese induzida por melanoma murino [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.

Scully C, Felix DH. Oral medicine – update for the dental practitioner oral cancer. *British Dental Journal* 2006; 200(1):13-7.

Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, *et al.* Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol.* 2004; 40(7):688-96.

Silva SD, Perez DE, Alves FA, Nishimoto IN, Pinto CA, Kowalski LP, *et al.* ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: Correlation with clinical outcomes. *Oral Oncol.* 2008; 44(5):484-90.

Stewart MJ, Parikh S, Xiao G, Tonge PJ, Kisker C. Structural basis and mechanism of enoyl-reductase inhibition by triclosan. *J. Mol. Biol.* 1999(4):290:859.

Stoops JK, Wakil SJ. Animal fatty acid synthase. A novel arrangement of the β -ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 1981; 256(10):5128-33.

Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Esquenet M, Heyns W, Verhoeven G. Androgens markedly stimulate the accumulation of neutral lipids in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Endocrinology.* 1996; 137(10):4468-74.

Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, Filippi S, *et al.* Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res.* 2003; 23(1A):335-9.

Wakil SJ. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 1989; 28(11):4523-30.