

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Inibidor da ácido graxo-sintase orlistate reduz a proliferação celular e induz apoptose em células de câncer cervical.

Jéssica Nascimento

Porto Alegre, dezembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
Trabalho de Conclusão de Curso

Inibidor da ácido graxo sintase orlistate reduz a proliferação celular e induz apoptose em células de câncer cervical.

Jéssica Nascimento

Trabalho final, apresentado a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Dra. Andréia Buffon  
Co-orientador: Dra. Débora Bastos

Porto Alegre, dezembro de 2016.

## RESUMO

Atualmente, já está bem estabelecido que o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo de útero é a infecção pelo papilomavírus humano (HPV). Entre os tipos de HPV mais frequentes, podemos citar o HPV 16 e o HPV 18, os quais são responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer de colo de útero. A proliferação descontrolada e acelerada de células anormais observada em neoplasias requer uma reprogramação metabólica para suprir as necessidades energéticas utilizadas na divisão celular. Proteínas, lipídios e ácidos nucleicos são fundamentais para que a célula tumoral possa proliferar. A síntese *de novo* de ácidos graxos surge como um mecanismo importante no fornecimento de lipídios. Este processo ocorre no citoplasma das células e é realizado pela enzima metabólica ácido graxo-sintase (FASN) através de reações de condensação entre acetil-CoA e malonil-CoA. Ainda, a proteína FASN possui um papel importante na homeostase energética, pois converte o excesso de carbono ingerido em ácidos graxos que podem ser utilizados para produzir energia através da  $\beta$ -oxidação. A FASN contribui para a produção de lipídios de membrana através da formação do seu principal produto, o palmitato. Devido a dieta rica em ácidos graxos, a síntese *de novo* e a atividade da FASN encontram-se em níveis baixos na maioria dos tecidos, com exceção do fígado, cérebro, tecido adiposo, pulmão e glândulas mamárias lactantes. Estudos tem demonstrado que muitas neoplasias malignas apresentam níveis elevados de FASN e que sua inibição, específica ou farmacológica, resulta em atividade antitumoral. A fármaco orlistate (ORL), foi originalmente desenvolvida para o tratamento da obesidade pois é um inibidor de lipases pancreáticas no trato gastrointestinal. No entanto, este composto mostrou ser um inibidor irreversível de FASN ao se ligar ao domínio tioesterase (TE), o qual é responsável pela liberação do palmitato. Neste trabalho foram utilizadas diferentes linhagens celulares de câncer de colo de útero (C-33A, ME-180, HeLa e SiHa), com objetivo de estudar os efeitos da inibição da FASN sobre a proliferação celular e indução de apoptose. As linhagens celulares foram tratadas com diferentes concentrações de ORL e estudos de proliferação e determinação de morte celular foram realizados através de contagem celular e marcação com Anexina V e iodeto de propídio. Assim como para outras linhagens celulares de diferentes neoplasias malignas, a inibição da FASN pelo ORL foi capaz de diminuir a viabilidade celular e causar apoptose em todas as linhagens celulares. No entanto, as linhagens SiHa e HeLa, que apresentaram uma maior expressão de FASN, foram também as linhagens em que a inibição da proliferação foi maior quando comparada com as linhagens C-33A e ME-180. Entre todas as linhagens estudadas a que menos expressou FASN foi a linhagem ME-180, que também mostrou ter menor redução na viabilidade celular. Também foi possível verificar que a diminuição na viabilidade ocorreu por apoptose e não por necrose, visto que, a porcentagem de células em necrose foi baixa em todas as linhagens após o tratamento com ORL. O presente trabalho, demonstrou pela primeira vez que diferentes linhagens celulares de câncer de colo de útero expressam FASN de forma desigual e que podem ser afetadas pela inibição farmacológica desta com ORL.

**Palavras chaves:** FASN, câncer de colo de útero, orlistate

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Conexão entre o metabolismo da glicose e síntese de ácidos graxos em células malignas.....	<b>8</b>
<b>Figura 2</b> Desenho esquemático da enzima FASN em sua estrutura homodimérica.....	<b>10</b>
<b>Figura 3</b> Expressão da proteína FASN nas linhagens de câncer de colo de útero.....	<b>19</b>
<b>Figura 4</b> Tratamento da linhagem celular C-33A com ORL 300 $\mu$ M .....	<b>20</b>
<b>Figura 5</b> Tratamento da linhagem celular HeLa com ORL 300 $\mu$ M.....	<b>21</b>
<b>Figura 6</b> Tratamento da linhagem ME-180 com ORL 300 $\mu$ M.....	<b>22</b>
<b>Figura 7</b> Tratamento da linhagem SiHa com ORL 300 $\mu$ M .....	<b>23</b>
<b>Figura 8</b> Análise comparativa dos índices de morte celular entre as linhagens de câncer de colo de útero submetidas ao tratamento com ORL 300 $\mu$ M.....	<b>24</b>
<b>Figura 9</b> Citometria de fluxo para Anexina V e iodeto de propídio após tratamento com ORL nas linhagens celulares C-33A, HeLa, ME-180 e SiHa. ....	<b>25</b>
<b>Figura 10</b> Citometria de fluxo para Anexina V e iodeto de propídio na linhagem celular C-33A. ....	<b>26</b>
<b>Figura 11</b> Citometria de fluxo para Anexina V e iodeto de propídio na linhagem celular HeLa.....	<b>27</b>
<b>Figura 12</b> Citometria de fluxo para Anexina V e iodeto de propídio na linhagem celular ME-180.....	<b>28</b>
<b>Figura 13</b> Citometria de fluxo para Anexina V e iodeto de propídio na linhagem celular SiHa. ....	<b>29</b>
<b>Figura 14</b> Análise comparativa entre as linhagens C-33A, HeLa, ME-180 e SiHa após tratamento com ORL.....	<b>30</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>4</b>
1.1. Câncer de Colo de Útero .....	4
1.2. Metabolismo Lipídico no Câncer .....	6
1.3. Ácido Graxo-Sintase (FASN).....	9
1.4. FASN e o câncer .....	11
1.5. Inibidores da FASN.....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1. Objetivos específicos.....	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1. Cultura de Células .....	15
3.2. Obtenção da solução de orlistate .....	15
3.3. Western Blot .....	15
3.4. Contagem celular.....	17
3.5. Citometria de fluxo para Anexina V e iodeto de propídio .....	17
3.6. Análise estatística.....	17
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
4.1. Expressão da proteína FASN nas linhagens de câncer de colo de útero .....	19
4.2. Inibição da FASN com Orlistate reduz a viabilidade celular.....	20
4.3. O tratamento com Orlistate induz apoptose nas linhagens celulares de câncer de colo de útero .....	24
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>35</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade que atingem a população mundial, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes em 2012 (IARC, 2012). Ainda, segundo dados do IARC, é esperado que estes números aumentem em 70% nas próximas duas décadas afetando principalmente, os países da África, Ásia, América Central, e América do Sul.

Câncer é o nome dado a um grande grupo de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais em diferentes tecidos e órgãos. O processo se inicia quando uma célula normal começa a se dividir sem controle, gerando células com potencial invasivo, que podem se multiplicar e invadir outros tecidos e órgãos dando origem a metástase, a qual é um dos principais motivos de morte relacionadas ao câncer (WHO, 2015).

Atualmente, está bem estabelecido que fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida podem contribuir para o aparecimento do câncer (INCA, 2012). No entanto, estudos visando o melhor entendimento da biologia celular do câncer e como esse processo de transformação ocorre, tornam-se cada vez mais necessários e podem contribuir para a descoberta de novos alvos terapêuticos e tratamentos mais eficazes.

### **1.1. Câncer de Colo de Útero**

O câncer de colo de útero representa um grande problema de saúde pública, sendo responsável por aproximadamente 528 mil novos casos e 266 mil mortes por ano no mundo (IARC, 2012). É a quarta neoplasia que mais afeta as mulheres e sua incidência é maior nos países menos desenvolvidos (IARC, 2012). No Brasil, o câncer de colo de útero é o terceiro tumor mais frequente na população feminina, com uma estimativa de 16.340 novos casos em 2016 (INCA, 2016).

Atualmente, já está bem estabelecido que o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer do colo do útero é a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (Walboomers et al., 1999). O HPV infecta células normais da camada basal da cérvix uterina, levando a uma transformação progressiva das células, que pode evoluir

para lesões precursoras do câncer de colo de útero, as quais, se não diagnosticadas e tratadas podem levar ao câncer (Ostor, 1993). A maioria das mulheres sexualmente ativas, em algum momento de suas vidas são infectadas pelo HPV, no entanto, 90% das infecções regridem espontaneamente em um ou dois anos (WHO, 2016).

Até o momento mais de 170 tipos de HPV foram identificados (de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004) porém, aproximadamente 18 deles são considerados de alto risco e estão associados ao câncer de colo de útero. Dentre estes, podemos destacar o HPV 16 e o HPV 18 como sendo os de maior risco oncogênico e responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer de colo de útero (Munoz et al., 2003; Smith et al., 2007).

O HPV possui em seu genoma 8 genes que codificam proteínas importantes para sua replicação (Baker et al., 1991), sendo os genes E6 e E7 os mais associados à transformação celular e consequente desenvolvimento do câncer (Ghittoni, Accardi, Chiocca, & Tommasino, 2015). Em infecções persistentes, o HPV pode integrar seu genoma ao da célula hospedeira. Este processo leva à transcrição dos genes das oncoproteínas E6 e E7. A oncoproteína E6 causa a degradação e inativação da proteína p53, inibindo a apoptose (White et al., 2012). Já a oncoproteína E7 se liga à proteína do retinoblastoma (pRb), a qual é responsável por regular a progressão do ciclo celular (Darnell et al., 2007). Ao perder estes importantes mecanismos associados ao controle da proliferação, as células do epitélio uterino passam a proliferar descontroladamente acumulando mutações que resultam no desenvolvimento do câncer (zur Hausen, 2002).

O tratamento do câncer de colo de útero é baseado no estadiamento da doença e sua classificação é realizada utilizando exame histopatológico e o sistema FIGO de estadiamento (International Federation of Gynecology and Obstetrics). Para pacientes em estágio I, onde a neoplasia ainda está restrita ao órgão, geralmente é realizada cirurgia, que na maioria dos casos é curativa. Já para pacientes em estágio 2, onde há crescimento extra uterino sem disseminação, e 3, onde há crescimento com disseminação para as paredes da pelve ou vagina, o tratamento de escolha é a quimioterapia e a radioterapia, com taxas de sucesso menores que para pacientes em estágio I. Para pacientes em estágio 4, onde ocorre a invasão da bexiga e/ou reto, o tratamento usualmente é paliativo e envolve quimioterapia, radioterapia e cirurgia (Denny,

Herrero, Levin, & Kim, 2015). Apesar dos inúmeros benefícios, estas opções de tratamentos geralmente causam efeitos adversos trazendo desconforto à paciente. Desta forma, estudos que permitam identificar novos alvos terapêuticos e que possam contribuir para o tratamento são ainda necessários.

Neste trabalho foram utilizadas diferentes linhagens celulares de câncer de colo de útero (C-33A, ME-180, HeLa e SiHa) com a finalidade de correlacionar os efeitos da FASN com as diferentes características celulares. A linhagem C-33<sup>A</sup> (ATCC<sup>®</sup>HTB-31<sup>TM</sup>), originada de um carcinoma uterino, não possui cópias do HPV inseridas em seu genoma. Já as linhagens HeLa (ATCC<sup>®</sup>CCL-2<sup>TM</sup>) e SiHa (ATCC<sup>®</sup>HTB-35<sup>TM</sup>), possuem cópias do HPV 18 e 16, respectivamente, inseridas no seu genoma. A linhagem HeLa é originada de um adenocarcinoma uterino e a linhagem SiHa de um carcinoma uterino de células escamosas estágio II. A linhagem ME-180 (ATCC<sup>®</sup>HTB-33<sup>TM</sup>), derivada de um sítio metastático no peritônio, possui cópias do HPV com grande homologia ao HPV 68 e é originada de um carcinoma epidermóide da cérvix.

## **1.2. Metabolismo Lipídico no Câncer**

A proliferação descontrolada e acelerada de células anormais observada em neoplasias requer uma reprogramação metabólica para suprir as necessidades energéticas utilizadas na divisão celular. Proteínas, lipídios e ácidos nucleicos são fundamentais para que a célula tumoral possa proliferar. Células que não são capazes de se adaptar acabam por não sobreviver, e somente aquelas com fenótipo alterado proliferam (Ghaffari, Mardinoglu, & Nielsen, 2015).

Otto Warburg foi o primeiro a sugerir uma associação entre alterações metabólicas e o desenvolvimento de neoplasias malignas. Ele verificou que células neoplásicas eram capazes de obter energia através da glicólise, mesmo na presença de O<sub>2</sub>, e que apesar desse processo produzir menos energia, a produção de ATP era mais eficiente que a oxidação mitocondrial. Esta observação foi chamada de glicólise anaeróbica ou efeito de Warburg e durante muitos anos foi aceita como uma das principais alterações metabólicas importantes para o desenvolvimento do câncer (Warburg, 1956).



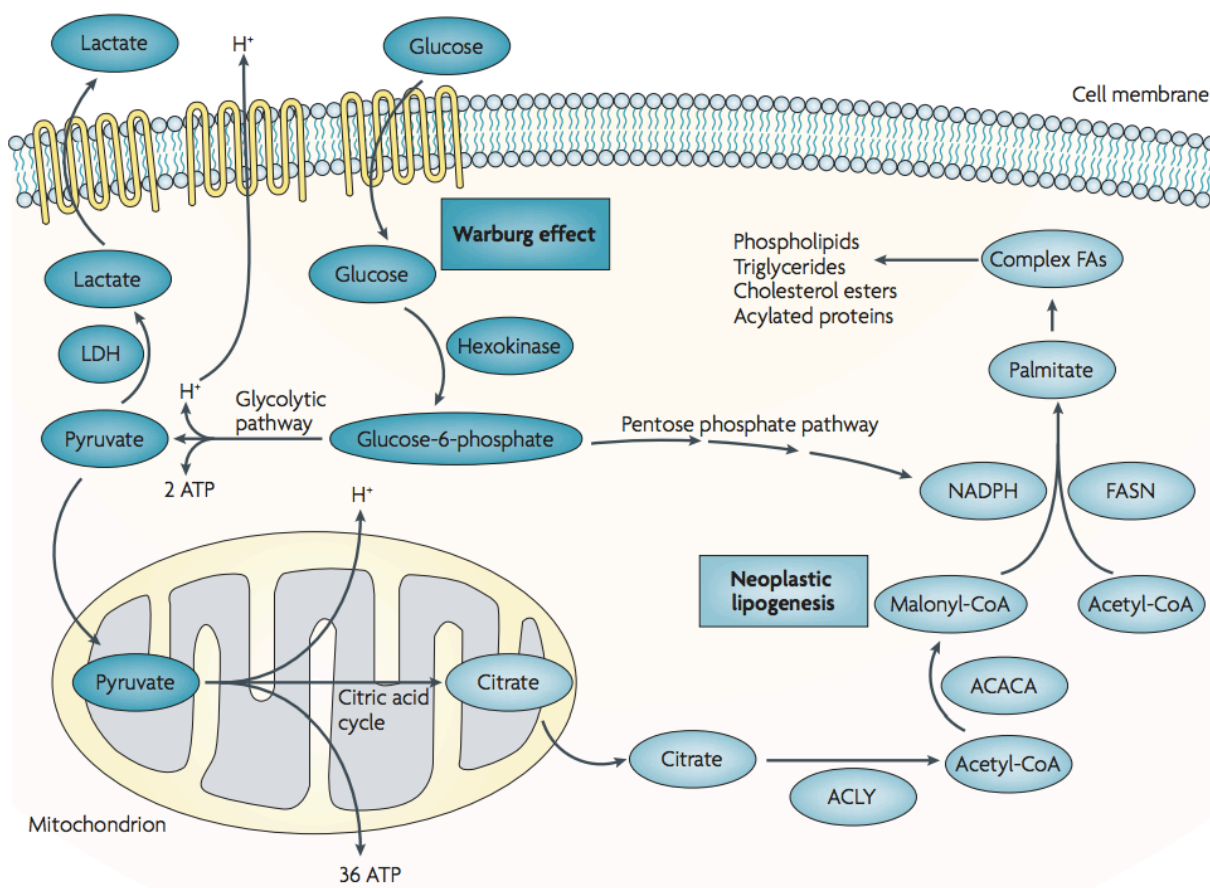
Entretanto, apesar do metabolismo aumentado da glicose ter sido inicialmente descrito como fator fundamental para a formação de neoplasias, muitos estudos têm demonstrado alterações em outras vias metabólicas e na expressão de diferentes enzimas, que por sua vez também contribuem para o fornecimento de energia e para a produção de macromoléculas importantes na divisão celular. Um exemplo é a síntese *de novo* de ácidos graxos que é fundamental para a produção de lipídios (Swinnen et al., 2003).

Os lipídios são essenciais para a divisão celular pois além de serem utilizados na construção da membrana plasmática, fornecerem energia para processos vitais, sinalizam e estimulam fatores de transcrição. No tecido normal, os lipídios são obtidos principalmente da alimentação diária, e a produção endógena de ácidos graxos está restrita ao tecido adiposo, pulmões, endométrio, fígado e glândulas mamárias lactantes (Weiss et al., 1986). Por outro lado, as células neoplásicas são capazes de sintetizar endogenamente os ácidos graxos, uma vez que sua superexpressão tem sido encontrada em diversas neoplasias malignas (Medes, Thomas, & Weinhouse, 1953; Swinnen et al., 2003).

A síntese *de novo* de ácidos graxos ocorre no citoplasma das células, onde unidades de dois carbonos são agrupadas a partir de uma molécula de acetil-CoA e uma molécula de malonil-CoA. A sequência de reações começa quando a glicose é convertida em acetil-CoA pela glicólise e em citrato na mitocôndria. O citrato, por sua vez, é transportado para o citoplasma e convertido novamente a acetil-CoA pela ATP citrato liase (ACLY). O acetil-CoA é então carboxilado a malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACACA), possibilitando assim, que a ácido graxo-sintase (FASN), na presença de NADPH possa condensar o malonil-CoA com o acetil-CoA para produzir o palmitato, um ácido graxo de 16 carbonos que posteriormente pode ser transformado em outros ácidos graxos (Figura 1) (Costello & Franklin, 2005).

Evidências de que a síntese *de novo* de ácidos graxos está ativada em células neoplásicas foi observada primeiramente com a utilização de C<sup>14</sup>-glicose. Neste estudo, a maior parte dos ácidos graxos esterificados encontrados no tumor foram produzidos através da síntese *de novo*, mesmo na presença de lipídios circulantes (Medes et al.,

1953). Posteriormente a este trabalho, outros estudos mostraram elevada expressão de FASN em diferentes tipos de câncer (Little & Kridel, 2008).



**Figura 1. Conexão entre o metabolismo da glicose e síntese de ácidos graxos em células malignas.** (Menendez & Lupu, 2007).

Além disso, outras enzimas participantes da síntese *de novo* de ácidos graxos também demonstraram elevada expressão em neoplasias. A enzima ATP-citrato liase (ACLY), por exemplo, encontra-se superexpressa em células tumorais e sua inibição *in vivo* causou uma diminuição na proliferação tumoral (Hatzivassiliou et al., 2005). Outra enzima importante desta via, acetil-CoA carboxilase (ACACA), também mostrou ser importante para o desenvolvimento neoplásico ao estar expressa em elevados níveis em células de câncer de mama (Chajes, Cambot, Moreau, Lenoir, & Joulin, 2006).

Tendo em vista, a importância da produção de ácidos graxos endógenos para as células tumorais, o bloqueio da síntese de ácidos graxos se torna um mecanismo pelo qual podemos impedir o desenvolvimento tumoral. Como visto anteriormente, são necessárias várias etapas para que a produção de ácidos graxos ocorra. Enzimas como a citrato liase (ACLY), acetil-CoA carboxilase (ACACA) e ácido graxo-sintase (FASN) são alvos terapêuticos em potencial. Além disso, muitas dessas enzimas encontram-se em níveis diminuídos em células não tumorais e sua associação com o desenvolvimento do câncer de colo de útero ainda não está descrito na literatura.

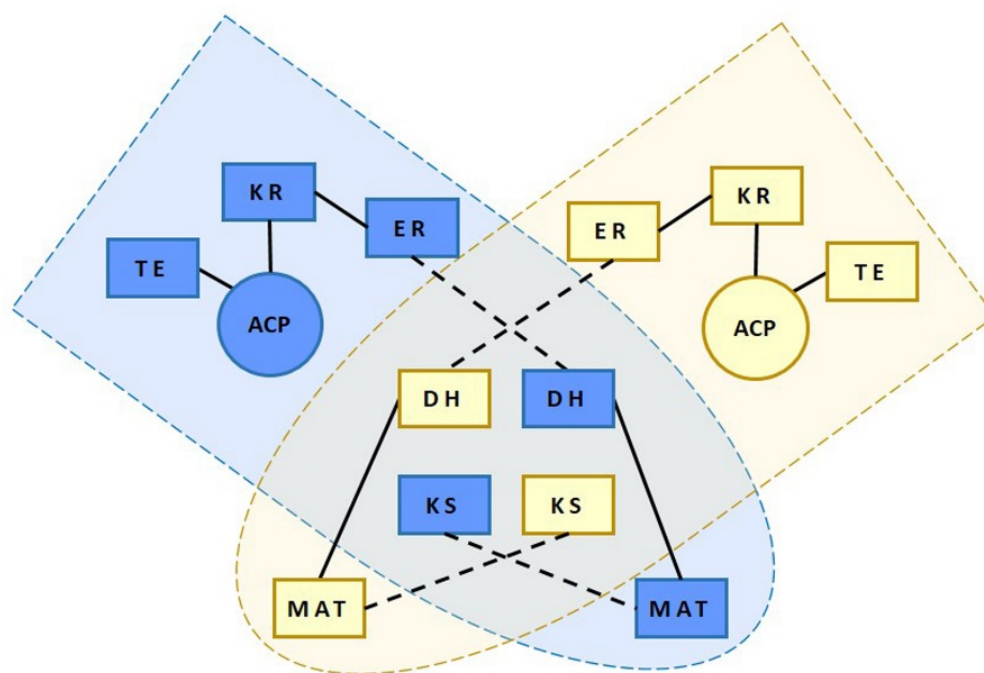
### **1.3. Ácido Graxo-Sintase (FASN)**

A proteína FASN é a principal enzima responsável pela síntese *de novo* de ácidos graxos através da condensação do malonil-CoA com o acetil-CoA. Ela possui um papel importante na homeostase energética, pois converte o excesso de carbono ingerido em ácidos graxos que, por sua vez, são armazenados e utilizados quando necessários para produzir energia através da  $\beta$ -oxidação. Além disso, ela contribui para a produção de lipídios de membrana, e é importante para a produção do leite materno e substância surfactante dos alvéolos pulmonares (Chirala & Wakil, 2004).

Existem dois tipos de FASN, FASN I e FASN II, e ambas têm a capacidade de produzir ácidos graxos. A FASN I (referida neste trabalho apenas como FASN), encontrada em mamíferos, consiste em duas cadeias polipeptídicas idênticas de 270 kD, onde cada uma possui 6 sítios catalíticos:  $\beta$ -cetoacil-ACP-sintase (KS), malonil/acetil-CoA-ACP-transferase (MAT),  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-desidratase (DH), enoil-ACP-redutase (ER),  $\beta$ -cetoacil-ACP-redutase (KR), tioesterase (TE) e um domínio transportador (proteína carreadora de acila - ACP) necessários para sua atividade enzimática (Maier, Jenni, & Ban, 2006; Maier, Leibundgut, & Ban, 2008).

Todos os sítios catalíticos participam na formação do palmitato, onde inicialmente a porção MAT transfere um grupo acetil oriundo do acetil-CoA para a porção ACP, que por sua vez transfere o grupo acetil para o sítio KS. Cada grupo malonil também é transferido para o sítio ACP pela porção MAT. Em seguida, o sítio KS realiza a condensação do malonil-ACP com o acetil-KS através de uma descarboxilação do grupo

malonil. O resultado desta reação forma o acetoacetyl-ACP, que é reduzido a butiril-ACP pelos sítios catalíticos DH, ER e KR. O butiril-ACP é então transferido para o sitio KS onde sofre uma nova condensação com outro grupo malonil. Cada molécula de malonil fornece dois carbonos para a reação e este ciclo de condensação e redução se repete até a formação do palmitato que é então liberado pela porção TE (Figura 2) (Little & Kridel, 2008).



**Figura 2. Desenho esquemático da enzima FASN em sua estrutura homodimérica.** FASN em sua estrutura em forma de "X" onde os monômeros (representados nas cores azul ou amarelo) permitem interações múltiplas intra (linhas simples) e inter cadeias (linhas pontilhadas). Domínios catalíticos: KS=  $\beta$ -cetoacil-ACP-sintase; MAT= malonil/acetil-CoA-ACP-transferase; DH=  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-desidratase; ER= enoil-ACP-redutase; KR=  $\beta$ -cetoacil-ACP-redutase; TE= tioesterase; ACP= proteína carregadora de acila. (Liu, Liu, Wu, & Zhang, 2010).

Devido a dieta rica em ácidos graxos, a síntese *de novo* e a atividade da FASN encontram-se em níveis baixos na maioria dos tecidos, com exceção do fígado, cérebro, tecido adiposo, pulmão e glândulas mamárias lactantes onde a lipogênese endógena é um importante processo (Jayakumar et al., 1995; Weiss et al., 1986). Além disso, estudos tem demonstrado que muitos tumores apresentam níveis elevados de FASN e que seus inibidores possuem atividade antitumoral (Menendez & Lupu, 2007).

#### 1.4. FASN e o câncer

De todas as enzimas envolvidas na síntese *de novo* de ácidos graxos, a FASN mostrou ser o melhor alvo terapêutico por sua distribuição e baixa expressão em células normais. Ainda, uma série de estudos tem demonstrado que sua expressão se encontra elevada em diferentes tipos tumorais como câncer de mama, próstata, bexiga, ovário, reto, esôfago, estômago, pulmão, tireóide, cabeça e pescoço, boca e endométrio (Kuhajda, 2000; Menendez & Lupu, 2007) e está associada ao prognóstico na maioria destas neoplasias malignas. No entanto, apesar de sua superexpressão estar bem estabelecida em células tumorais, os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não foram totalmente esclarecidos.

Diferentes estudos têm associado a expressão de FASN com a via de proliferação PI3K/AKT. Nesta cascata de sinalização, receptores de fatores de crescimento ao serem ativados, levariam a consequente ativação da cascata PI3K/AKT. A AKT ativada, por sua vez, estimularia a síntese de fatores de transcrição, como por exemplo o SRBP1c, que então causaria um aumento na transcrição da FASN. Essa teoria tem como suporte o fato de que ao se inibir a cascata da PI3K/AKT uma diminuição da expressão de FASN e de seu fator de transcrição também podem ser vistas (Van de Sande, De Schrijver, Heyns, Verhoeven, & Swinnen, 2002).

A necessidade de produção endógena de FASN tem sido atribuída ainda, a manutenção dos níveis de lipídeos necessários para os processos vitais de células altamente proliferativas como a palmitoilação de proteínas, restauração do potencial de oxidação através do consumo de NADPH em condições de hipóxia, além da regulação dos “lipid rafts”, estruturas da membrana plasmática que regulam a sinalização celular, tráfico intracelular de moléculas, polarização, migração e invasão de células tumorais (Coleman, Bigelow, & Cardelli, 2009; Swinnen et al., 2003).

A alta expressão de FASN, também tem sido ligada a um pior prognóstico e resistência a quimioterapia (Wu, Qin, Fako, & Zhang, 2014). Estudos utilizando inibidores, mostraram que sua inibição levou a uma diminuição na proliferação celular, com posterior morte por apoptose (Li et al., 2001; Pizer, Chrest, DiGiuseppe, & Han, 1998; Zhou et al.,

2003). Ainda, ao se inibir a FASN, pode-se observar uma parada no ciclo celular e aumento na sobrevivência de modelos xenográficos (Flavin, Peluso, Nguyen, & Loda, 2010).

### **1.5. Inibidores da FASN**

Muitos estudos têm demonstrado que a FASN pode se tornar um alvo terapêutico de grande relevância pois está superexpressa e associada a um pior prognóstico em diferentes tipos de câncer. Além disso, como descrito anteriormente, estudos que utilizaram inibidores da FASN mostraram o importante papel desta enzima para a sobrevivência e proliferação das células neoplásicas.

Atualmente, são conhecidas diversas substâncias com potencial para inibir a atividade da FASN. Entre elas as mais conhecidas são: cerulenina, C75, orlistate, C93 e polifenóis naturais (Flavin et al., 2010; Mullen & Yet, 2015). A cerulenina, é um produto metabólico do fungo *Cephalosporium caerulens*, que tem poder de inibir a biossíntese de esteróis e ácidos graxos (Flavin et al., 2010). A cerulenina foi o primeiro composto a mostrar atividade inibitória da FASN ligando-se ao domínio KS, e assim impedindo a condensação entre o ácido graxo alongado e resíduos de acetil e malonil (Mullen & Yet, 2015). Este composto mostrou ter atividade antitumoral em células de câncer de mama, melanoma, câncer ocular e ovariano (Pizer et al., 1996). No entanto, a cerulenina apresenta instabilidade química devido a um grupo epóxi altamente reativo e consequentemente efeitos tóxicos que impedem sua utilização em modelos animais (Lupu & Menendez, 2006).

Na tentativa de diminuir os efeitos adversos e melhorar a estabilidade da cerulenina, o composto C75 foi sintetizado (Kuhajda et al., 2000). Ele apresenta efeito inibitório da FASN ao se ligar aos domínios KS, ER e TE (Rendina & Cheng, 2005). Assim como a cerulenina, apresenta atividade antitumoral em células de câncer de mama sendo o seu uso a primeira evidência *in vivo* da diminuição da progressão tumoral devido ao bloqueio da FASN. Apesar dos esforços em diminuir os efeitos adversos, o composto C75 promove perda de peso e anorexia em estudos *in vivo* (Kuhajda et al., 2000).

O fármaco orlistate (ORL), foi originalmente desenvolvida para o tratamento da obesidade pois é um inibidor de lípases pancreáticas no trato gastrointestinal. No entanto, este composto mostrou ser um inibidor irreversível de FASN ao se ligar ao domínio tioesterase (TE), o qual é responsável por terminar a produção do palmitato (Kridel, Axelrod, Rozenkrantz, & Smith, 2004). O orlistate apresenta alguns problemas para sua utilização como droga antitumoral pois é extremamente insolúvel, tem baixa permeabilidade e possui baixa biodisponibilidade (Lupu & Menendez, 2006). Apesar disso, muitos estudos têm demonstrado que o orlistate tem poder de inibir a FASN diminuindo a proliferação e causando morte celular programada em diferentes tipos de linhagens tumorais (Agostini et al., 2014; Carvalho et al., 2008; Mullen & Yet, 2015; Seguin et al., 2012). Atualmente existe um esforço da indústria farmacêutica para desenvolver análogos ao orlistate eliminando seus problemas farmacológicos (Mullen & Yet, 2015).

Muitos compostos naturais têm mostrado poder de inibir a FASN e entre eles podemos citar o polifenol epigallocatequina-3-galato (EGCG) (Mullen & Yet, 2015). O EGCG, um composto derivado do chá verde, mostrou possuir atividade apoptótica e capacidade de impedir a formação e desenvolvimento de tumores em modelos animais (Brusselmans, De Schrijver, Heyns, Verhoeven, & Swinnen, 2003). Outro inibidor recentemente sintetizado para tentar eliminar os efeitos adversos da cerulenina e do C75 foi a molécula C93 (ou FAS93). Este composto mostrou atividade antitumoral em modelos animais para câncer de pulmão de células não-pequenas e ovário. Mais importante, este composto não causou anorexia ou perda de peso nos animais (Orita et al., 2007). Além disso, devido ao potencial antitumoral que os inibidores da FASN apresentam, grandes indústrias farmacêuticas como Glaxo, AstraZeneca e Merck, já demonstraram interesse em desenvolver moléculas mais específicas e que sejam menos tóxicas e causem menos efeitos adversos (Mullen & Yet, 2015).

## **2. OBJETIVOS**

Este trabalho tem como objetivo principal estudar os efeitos da inibição da enzima ácido graxo-sintase (FASN) sobre a viabilidade celular e taxas de apoptose em diferentes linhagens celulares de câncer de colo de útero.

### **2.1. Objetivos específicos**

1. Verificar e comparar a expressão proteica da FASN nas linhagens de câncer de colo de útero SiHa, HeLa, C-33A e ME-180.
2. Verificar e comparar o efeito do inibidor de FASN, orlistate, na viabilidade celular das linhagens SiHa, HeLa, C-33A e ME-180.
3. Avaliar e comparar os efeitos da inibição da FASN após tratamento com orlistate na indução de apoptose em linhagens SiHa, HeLa, C-33A e ME-180.
4. Comparar os efeitos da inibição da FASN nas diferentes linhagens correlacionando com a agressividade destas células.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Cultura de Células**

Para a realização deste trabalho foram utilizadas as linhagens de câncer cervical humano, SiHa (HPV 16-positiva), HeLa (HPV 18-positiva), C-33A (HPV-negativa), e ME-180 (célula derivada de sítio metastático e HPV 68-positiva). Todas as quatro linhagens foram adquiridas da ATCC e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Massimo Loda do Departamento de Oncologia do Hospital Dana-Farber, Harvard. As linhagens SiHa, HeLa e C-33A foram mantidas em meio de cultura DMEM Low Glicose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, Grand Island, NY) e mantidas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A linhagem ME-180 foi mantida nas mesmas condições utilizando meio de cultura RPMI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) também suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY).

#### **3.2. Obtenção da solução de orlistate**

Orlistate (ORL) foi extraído de cápsulas de Xenical de acordo com Knowles e colaboradores (Knowles, Axelrod, Browne, & Smith, 2004). O conteúdo de uma cápsula foi solubilizado durante 30 minutos em 1 mL de etanol e centrifugado durante 5 min a 12.000 g. O sobrenadante (250 mM de orlistate) foi mantido a -80 °C.

#### **3.3. Western Blotting**

As células C-33A, HeLa, ME-180 e SiHa foram plaqueadas em placas de 100mm e mantidas em cultura por 48 horas. Após, o meio de cultura foi descartado e meio de cultura sem suplementação de SFB foi adicionado. Posteriormente ao período de incubação, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de NP-40, 20mM de Tris-HCl pH 8,0, 137mM de NaCl, 10% de glicerol, 2mM de EDTA suplementado com inibidores de

protease de acordo com o fabricante (Complete Mini Cocktail EDTA-free, Roche Diagnostics – Mannheim, Alemanha) e inibidores de fosfatases (0.1 mM de NaF e 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, e 1 mM de PMSF). A solução proteica foi mantida no gelo por 30 minutos, sendo homogeneizada a cada 10 minutos. Depois deste período, foi realizada centrifugação a 14.000 g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados. A concentração de proteína total dos extratos proteicos foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se o reagente de Bradford (Biorad, E.U.A.) e um espectrofotômetro Spectronic Genesys 2 ajustado para 595nm. Quantidades iguais de proteínas de cada extrato celular (30µg) foram misturadas com um tampão redutor de amostra concentrado quatro vezes (8% de SDS, 0,25M de Tris-HCl pH 6,8, 30% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol), contendo 20% do volume total de DL-Ditiotreitol (DTT, Sigma, E.U.A.), fervidas por 5 minutos e separadas eletroforéticamente em géis de poliacrilamida- SDS a 8%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond, GE Healthcare, E.U.A.) e coradas com "Ponceau S" (Sigma, E.U.A.) para verificar a eficácia da transferência. Após bloqueio por 1h em solução a 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20mM de Tris-HCl pH 7,6, 150mM de NaCl e 1% de Tween 20 (TBST), as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos primários anti-FASN (1:3.000, Transduction Laboratories, E.U.A) e anti-β-actina (1:40.000, clone AC-15, Sigma, E.U.A). O anticorpo contra a proteína de citoesqueleto β-actina foi usado como controle da quantidade da proteína aplicada em cada canaleta. Depois de lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse fluorescente 1:100 (Abcam) as reações foram reveladas através do aparelho UVITEC utilizando filtros ultravioleta para detecção de fluorescência. Imagens sequenciais de 30 segundos foram obtidas até que a saturação da reação foi atingida. Análises densitométricas das bandas relativas a quantidade de proteínas FASN e β-actina foram realizadas em software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

### **3.4. Contagem celular**

As linhagens celulares foram plaqueadas ( $5 \times 10^3$  células) em placas de 24 poços, e mantidas em cultura por 48 horas. Após, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas durante 24 horas com meio de cultura sem suplementação de SFB. Meio de cultura contendo SFB foi adicionado novamente e as células foram tratadas com orlistate  $300 \mu\text{M}$  por 24, 48 e 72 horas de acordo com Carvalho e colaboradores (Carvalho et al., 2008). Após, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas com 0,25% tripsina/EDTA, e o meio de cultura foi adicionado. As amostras foram analisadas utilizando citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### **3.5. Citometria de fluxo para Anexina V/IP**

Para determinar o tipo de morte celular, as linhagens celulares foram tratadas com orlistate nas concentrações de  $200 \mu\text{M}$ ,  $300 \mu\text{M}$  e  $400 \mu\text{M}$  durante 48 horas de acordo com Carvalho e colaboradores (Carvalho et al., 2008). Após o tratamento, o sobrenadante foi recolhido, as células foram lavadas, tripsinizadas, e centrifugadas durante 6 minutos na velocidade de 300 g. O sobrenadante foi descartado, as células foram incubadas com  $0,75 \mu\text{L}$ /amostra de anexina (quatroG, Porto Alegre, RS, BR) e  $15 \mu\text{L}$ /amostra de iodeto de propídio (quatroG, Porto Alegre, RS, BR), diluídos em  $150 \mu\text{L}$  de tampão de ligação ( $0,1 \text{ M}$  de HEPES/NaOH pH 7,4,  $1,4 \text{ M}$  de NaCl e  $25 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ ), por 15 minutos à temperatura ambiente. Foram utilizados como controle positivo de apoptose, cisplatina  $100 \mu\text{M}$ , e como controle positivo de necrose, Triton X-100 0,1%. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### **3.6. Análise estatística**

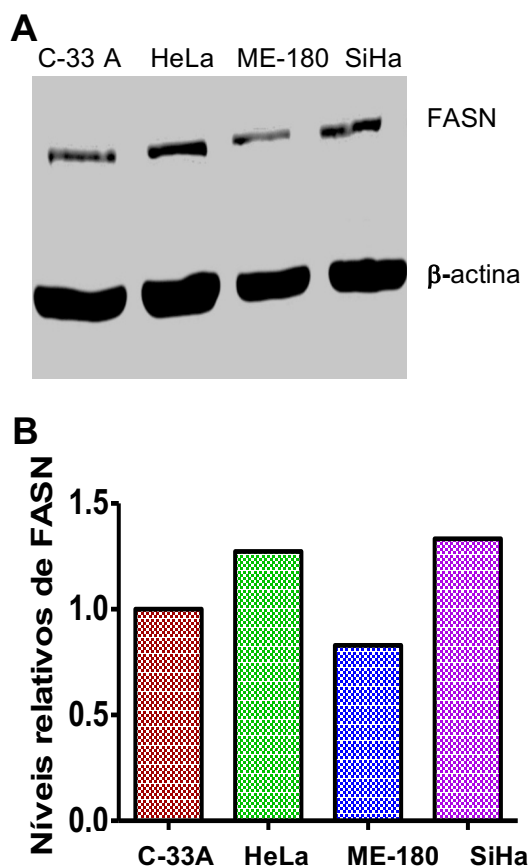
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP (desvio padrão) de três experimentos em triplicata. Para distribuição paramétrica, os dados foram analisados

utilizando análise de uma via de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey no programa Graph Pad Prism 5. Para distribuição não-paramétrica dos dados foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Os resultados foram considerados significativos para valores de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Expressão da proteína FASN nas linhagens de câncer de colo de útero

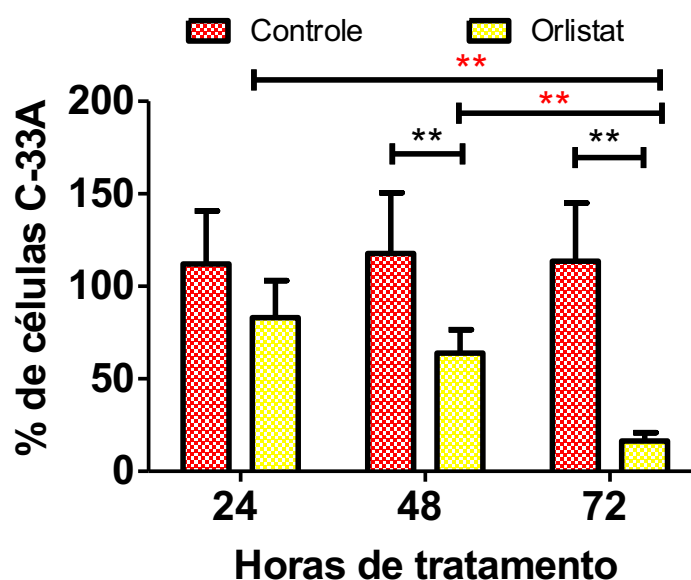
Para verificar a presença da proteína FASN nas linhagens celulares de câncer cervical SiHa (HPV 16-positiva), HeLa (HPV 18-positiva), C-33A (HPV-negativa), e ME-180 (célula derivada de sítio metastático), as células foram cultivadas até atingirem a subconfluência e os níveis de FASN foram determinados através de separação eletroforética seguida por reação de Western Blotting. Como pode ser visto na Figura 3A, todas as linhagens estudadas apresentaram imunopositividade para FASN. No gráfico mostrado na Figura 3B nota-se que as linhagens SiHa e HeLa apresentaram níveis mais elevados quando comparado com as demais linhagens.



**Figura 3. Expressão da proteína FASN nas linhagens de câncer de colo de útero.** Os níveis da proteína FASN normalizados pelo controle endógeno  $\beta$ -actina foram maiores nas células HeLa e SiHa quando comparadas as células C-33A e ME-180. Resultado representativo de um único experimento.

## 4.2. Inibição da FASN com Orlistate reduz a viabilidade de células de câncer de colo de útero

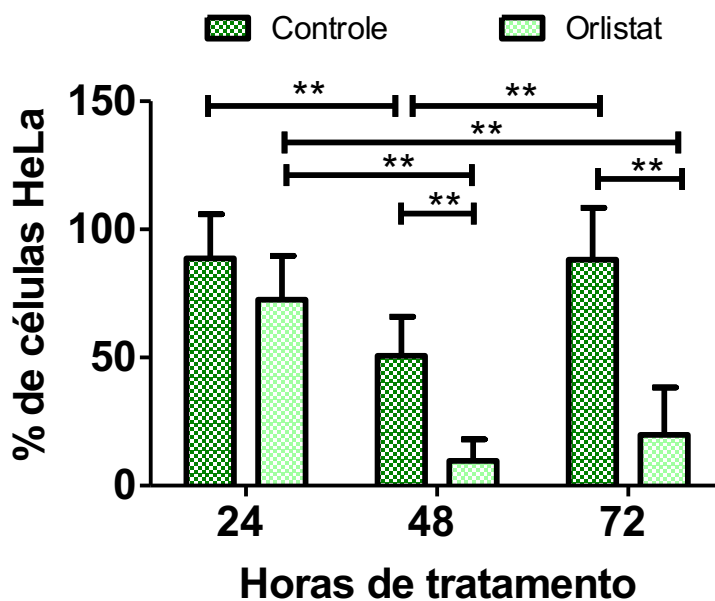
Para avaliar os efeitos citotóxicos do ORL, as linhagens celulares SiHa, HeLa, C-33A e ME-180 foram plaqueadas e tratadas com 300  $\mu$ M de ORL durante 24, 48 e 72 horas. A contagem das células viáveis foi realizada em citômetro de fluxo. Na Figura 4 podemos observar que o tratamento com ORL por 48 e 72 horas reduziu significativamente o número de células viáveis da linhagem C-33A em comparação aos respectivos controles. Além disso, podemos observar que a redução ocorreu de maneira tempo-dependente.



**Figura 4.** Tratamento da linhagem celular C-33A com ORL 300  $\mu$ M durante 24, 48 e 72 horas. O tratamento com ORL por 48 e 72 horas reduziu significativamente o número de células viáveis da linhagem C-33A em comparação aos respectivos controles. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de n=3. Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

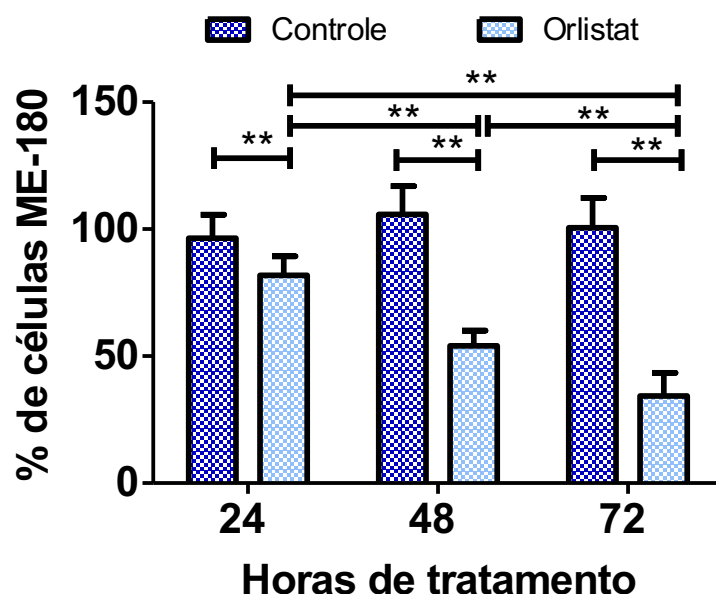
Assim como para a linhagem C-33A, o tratamento com 300  $\mu$ M de ORL também reduziu o número de células viáveis da linhagem HeLa após 48 e 72 horas em relação aos respectivos controles (Figura 5), com máxima redução após 48 horas de tratamento. Além disso, houve uma redução importante do número de células no grupo controle após 48 horas de incubação seguido de recuperação após 72 horas de tratamento, o que não

foi observado no grupo tratado com ORL. Este fenômeno se repetiu em 3 experimentos independentes e, portanto, o que levou a este efeito necessita ser melhor investigado.



**Figura 5. Tratamento da linhagem celular HeLa com ORL 300  $\mu$ M durante 24, 48 e 72 horas.** O tratamento com ORL por 48 e 72 horas reduziu significativamente o número de células viáveis da linhagem HeLa em comparação aos respectivos controles. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de n=3. Os dados foram analisados através do teste ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

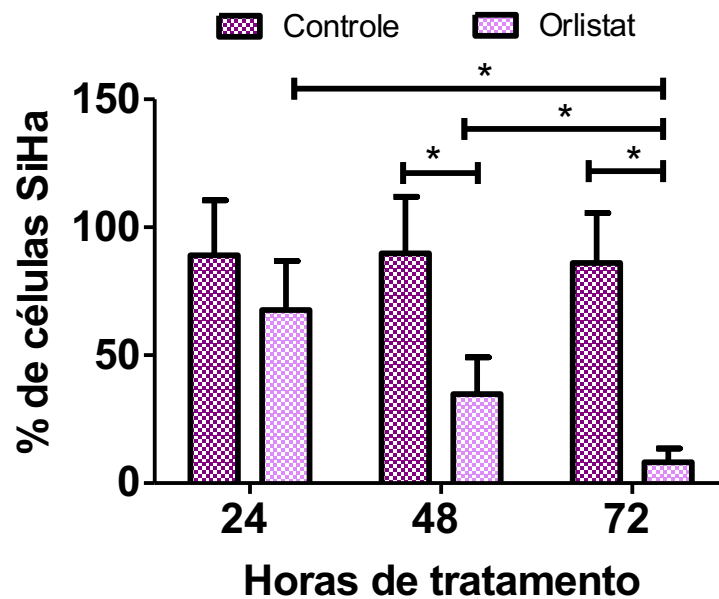
A linhagem ME-180 também apresentou uma redução no número de células viáveis, que já pode ser observada a partir de 24 horas de tratamento. Além disso, esta redução foi tempo-dependente (Figura 6).



**Figura 6. Tratamento da linhagem ME-180 com ORL 300  $\mu$ M durante 24, 48 e 72 horas.** O tratamento com ORL por 24, 48 e 72 horas reduziu significativamente o número de células viáveis da linhagem ME-180 em comparação aos respectivos controles. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de n=3. Os dados foram analisados através do teste ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

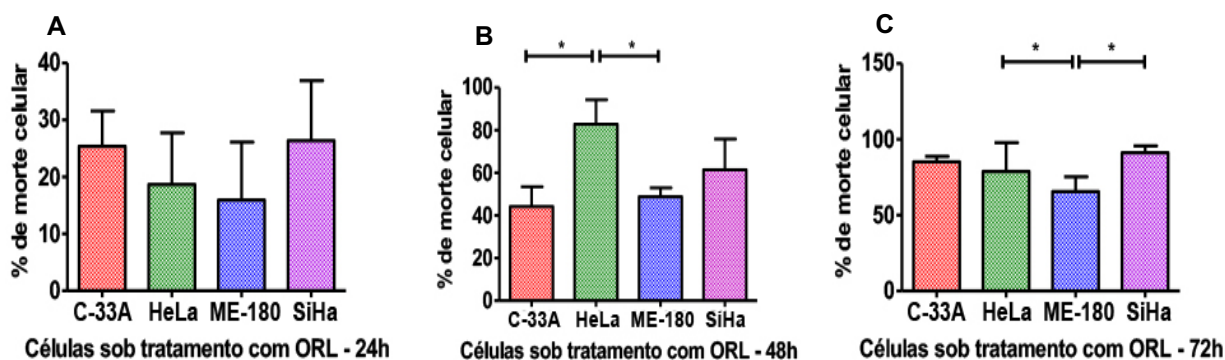
Quando avaliamos o efeito do ORL nas células SiHa tratadas observamos uma redução no número de células viáveis em comparação aos respectivos controles para os tempos de 48 e 72 horas (Figura 7). Além disso, podemos observar uma redução tempo-dependente a partir de 48 horas de tratamento com ORL.





**Figura 7. Tratamento da linhagem SiHa com ORL 300  $\mu$ M durante 24, 48 e 72 hora.** O tratamento com ORL por 48 e 72 horas reduziu significativamente o número de células viáveis da linhagem SiHa em comparação aos respectivos controles. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de n=3. Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

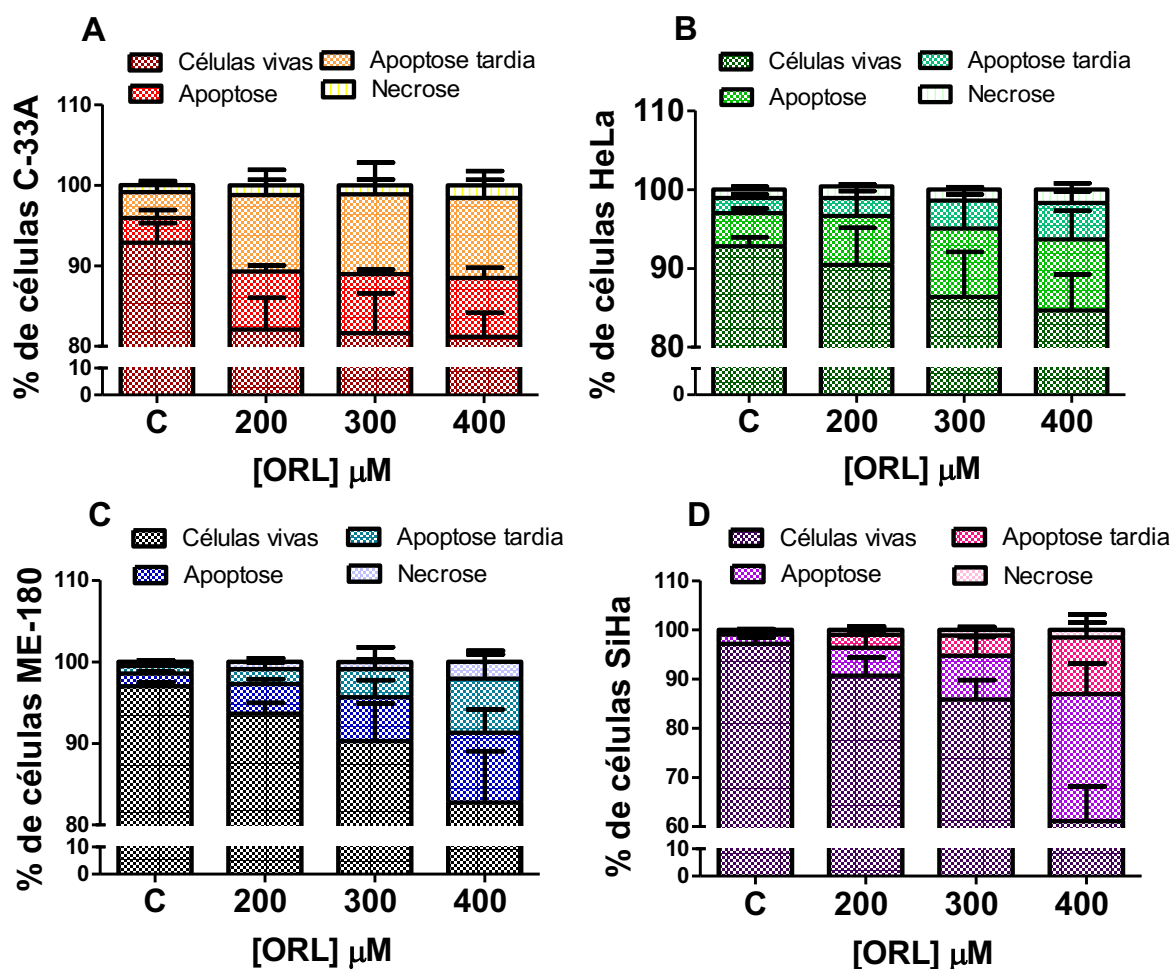
Os índices de morte celular também foram comparados entre as células de câncer de colo de útero submetidas ao tratamento com ORL por 24 horas. Entretanto, não observamos diferenças significativas entre as linhagens estudadas neste tempo (Figura 8A). Após 48 horas de tratamento, as células HeLa apresentaram maior porcentagem de morte celular quando comparada com as células C-33A e ME-180 (Figura 8B). Além disso, após 72 horas de tratamento com ORL, a linhagem ME-180 apresentou menor porcentagem de morte celular quando comparada com as células HeLa e SiHa (Figura 8C).



**Figura 8. Análise comparativa dos índices de morte celular entre as linhagens de câncer de colo de útero submetidas ao tratamento com 300  $\mu$ M durante os tempos de 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de um n=3. Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn. Valores significativos para  $p < 0,05$ .**

### **4.3. O tratamento com Orlistate induz apoptose nas linhagens celulares de câncer de colo de útero**

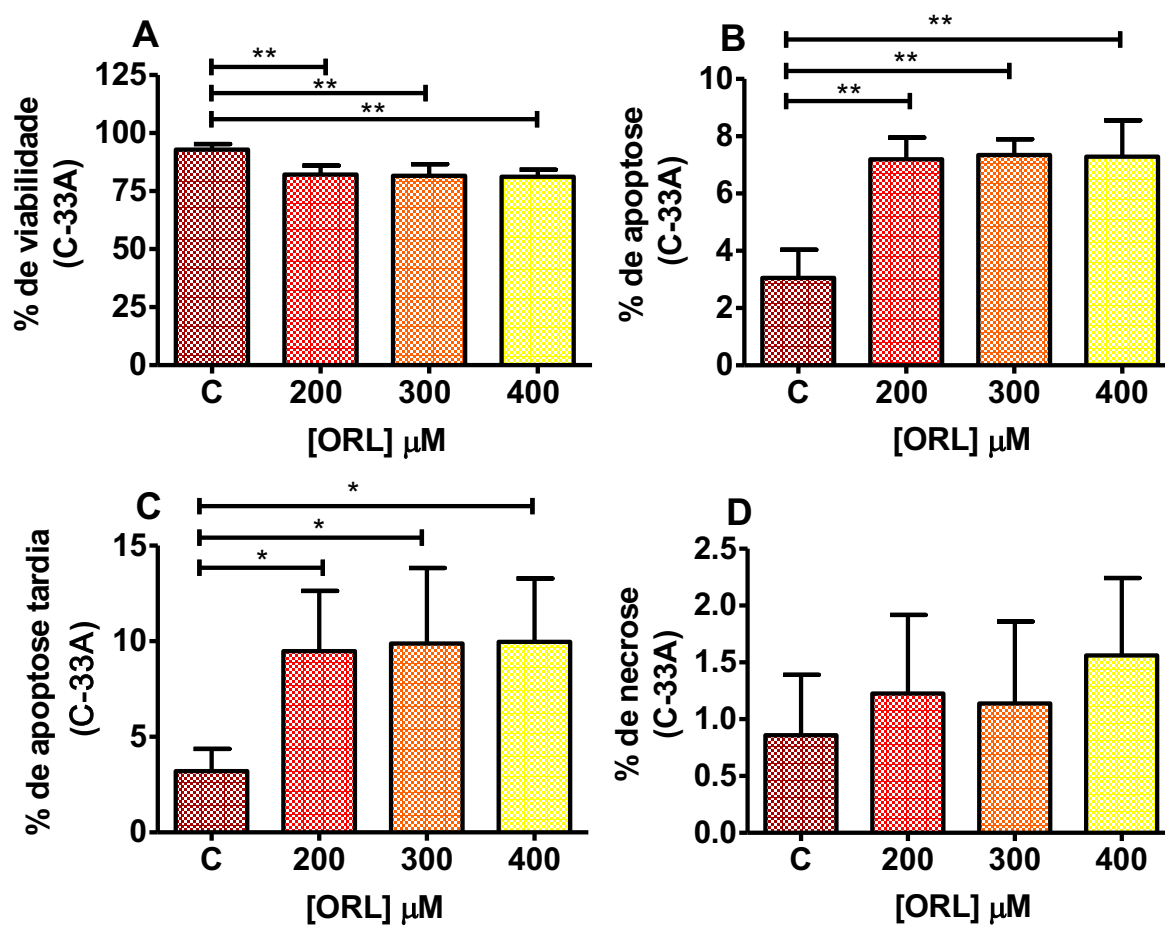
Para investigar se a redução na viabilidade celular esta relacionada com os mecanismos de apoptose e necrose, foi realizado citometria de fluxo com dupla marcação para Anexina V e iodeto de propídio. As linhagens celulares de câncer de colo de útero foram submetidas ao tratamento com ORL nas concentrações de 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M e 400  $\mu$ M por um período de 48 horas.



**Figura 9.** Análise de citometria de fluxo para apoptose, apoptose tardia e necrose após 48 horas de tratamento com 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  e 400  $\mu\text{M}$  de ORL nas linhagens celulares C-33A (A), HeLa (B), ME-180 (C) e SiHa (D). Todas as linhagens apresentaram aumento no número células apoptóticas em todas as concentrações quando comparadas ao controle.

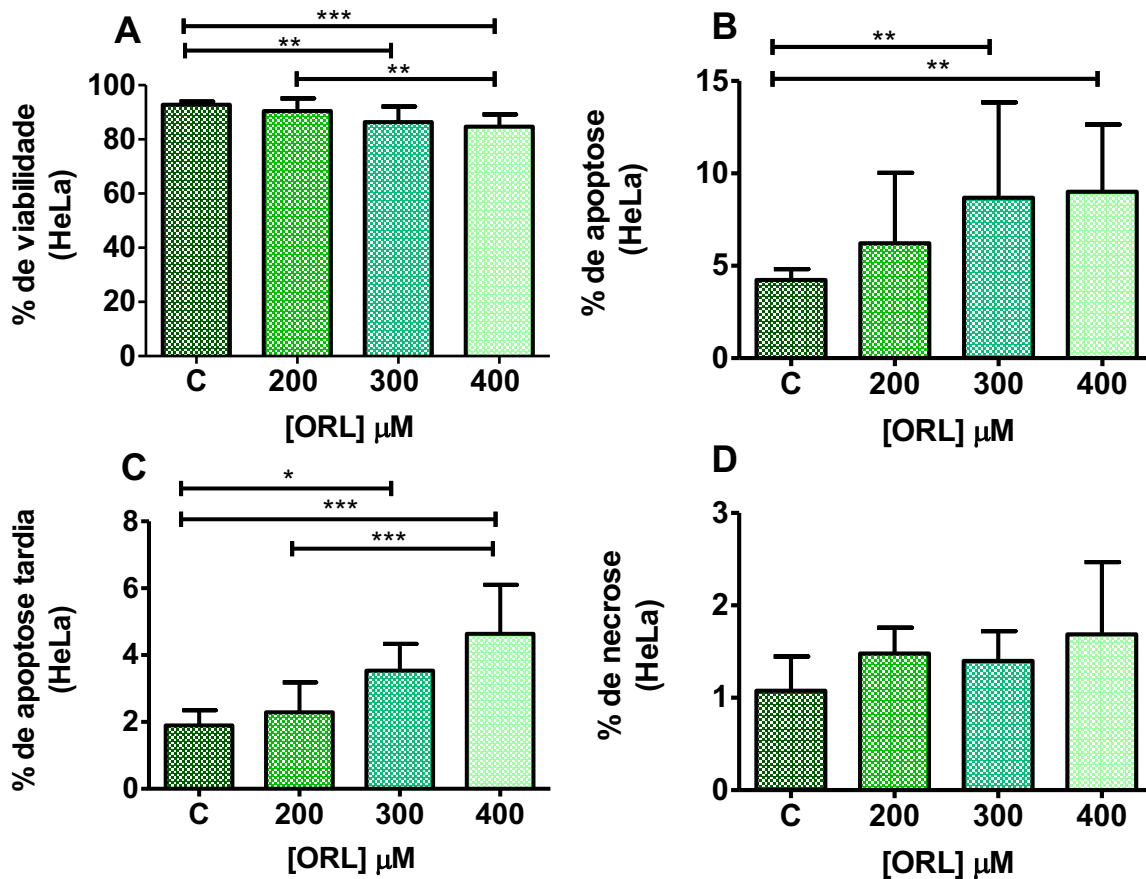
Como demonstrado na Figura 9, as linhagens celulares de C-33A (Figura 9A), HeLa (Figura 9B), ME-180 (Figura 9C) e SiHa (Figura 9D) apresentaram um aumento de células em apoptose em todas os tratamentos, quando comparadas aos controles. Também podemos observar que a proporção de células em apoptose inicial e tardia acompanhou o aumento das concentrações, a exceção da linhagem C-33A, que se manteve constante. Além disso, podemos observar que não houve um aumento significativo na proporção de células marcadas por iodeto de propídio, mostrando que a diminuição na viabilidade celular não está ocorrendo por necrose.

A análise estatística referente a Figura 9A está representada na Figura 10. Observamos que todas as concentrações estudadas reduziram significativamente a viabilidade das células C-33A (Figura 10A). Além disso, o tratamento com ORL aumentou significativamente as taxas de apoptose (Figura 10B) e apoptose tardia (Figura 10C). As taxas de necrose não foram alteradas nas células tratadas com ORL (Figura 10D).



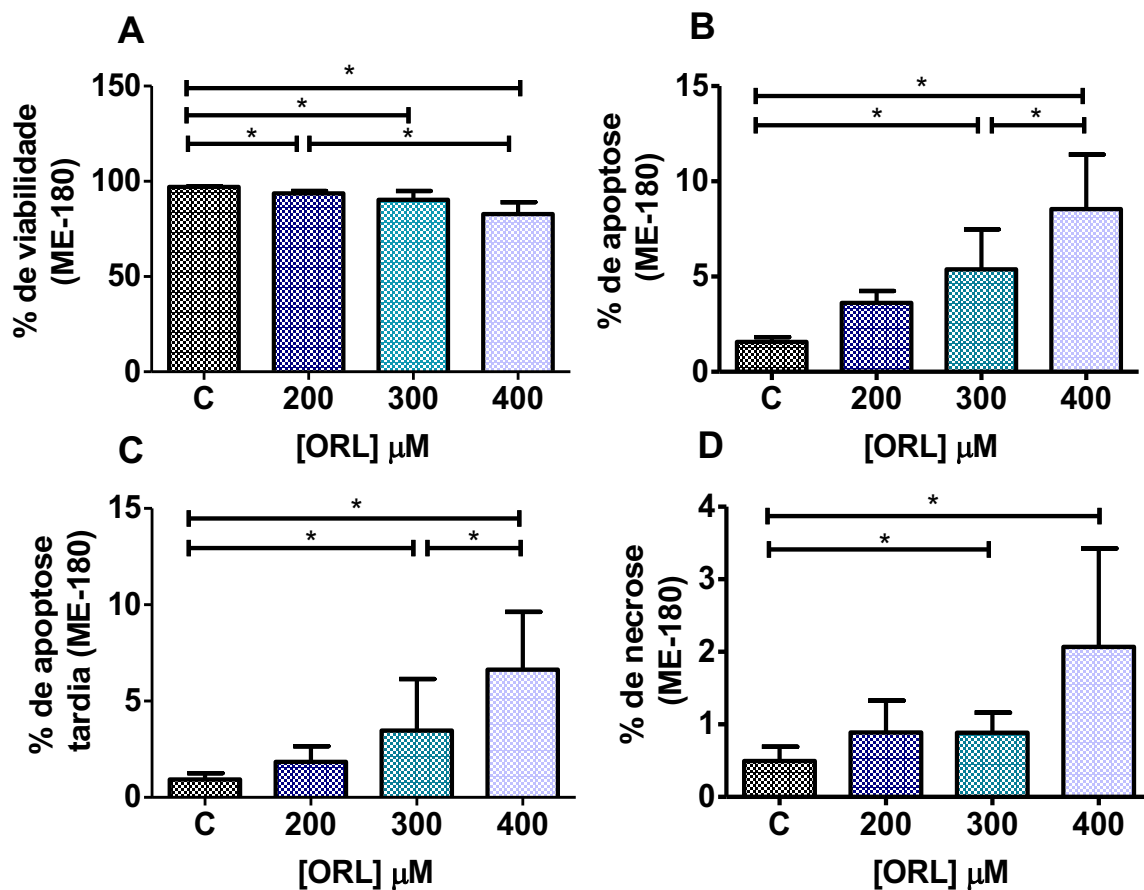
**Figura 10. Citometria de fluxo com dupla marcação para Anexina V e iodeto de propídio.** Análise dos resultados obtidos através da citometria de fluxo revelaram uma redução das células viáveis (A) e aumento das taxas de apoptose (B) e apoptose tardia (C) sem afetar os índices de necrose (D) em relação ao controle após 48 horas de tratamento com ORL na linhagem celular C-33A. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de  $n=3$ . Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn. Valores significativos para  $p<0,05$ .

O tratamento da linhagem HeLa com 300  $\mu\text{M}$  e 400  $\mu\text{M}$  de ORL, reduziu significativamente a viabilidade (Figura 11A) e aumentou as taxas de apoptose (Figura 11B) e apoptose tardia (Figura 11C) sem afetar as taxas de necrose (Figura 11D).



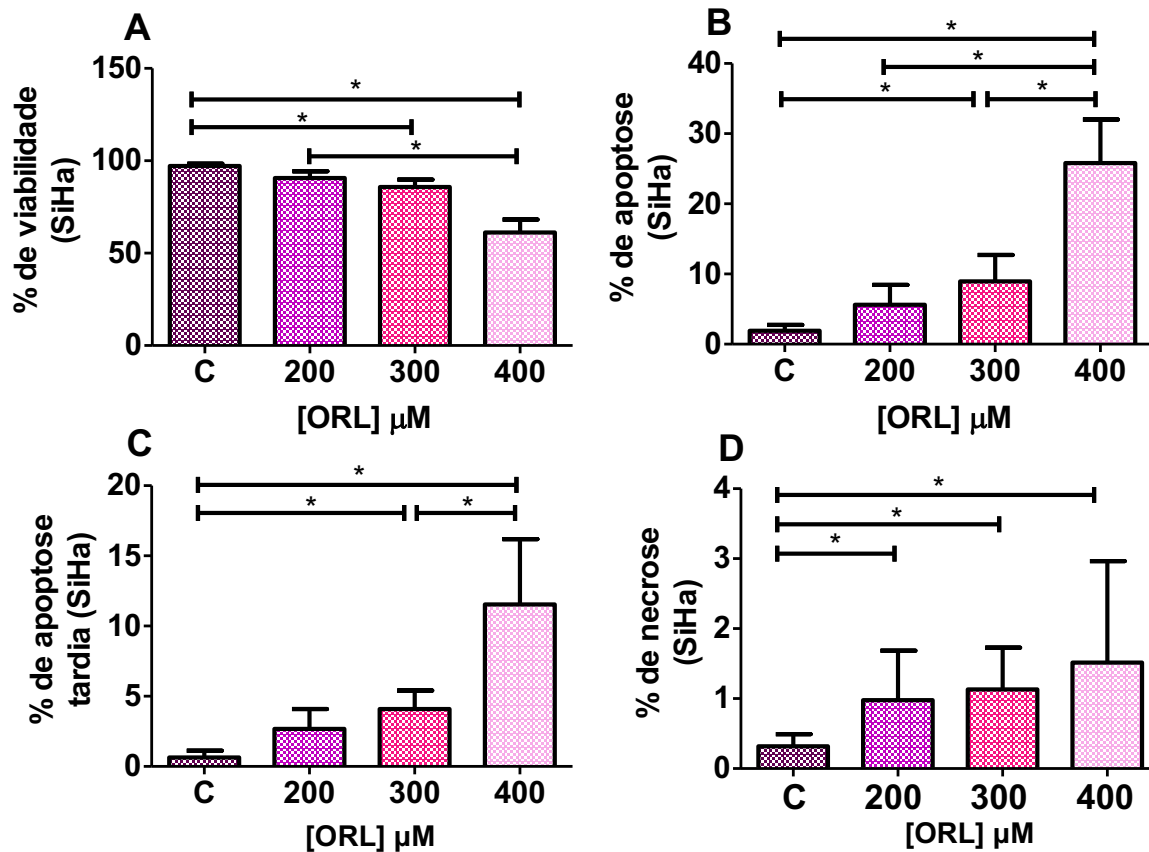
**Figura 11. Citometria de fluxo com dupla marcação para Anexina V e iodeto de propídio.** Análise dos resultados obtidos através da citometria de fluxo revelaram uma redução das células viáveis (A) e aumento das taxas de apoptose (B) e apoptose tardia (C) sem afetar os índices de necrose (D) em relação ao controle após 48 horas de tratamento com ORL na linhagem celular HeLa. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de n=3. Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

Para a linhagem celular ME-180 podemos observar uma redução significativa na viabilidade celular após 48 horas de tratamento com 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M e 400  $\mu$ M de ORL (Figura 12A). Além disso, os índices de apoptose (Figura 12B), apoptose tardia (Figura 12C) e necrose (Figura 8D) foram significativamente aumentados em todas as concentrações utilizadas de ORL. Além disso, a partir de 300  $\mu$ M houve aumento dose-dependente das taxas de apoptose, apoptose tardia e necrose.



**Figura 12. Citometria de fluxo com dupla marcação para Anexina V e iodeto de propídio.** Análise dos resultados obtidos através da citometria de fluxo revelaram uma redução das células viáveis (A) e aumento das taxas de apoptose (B) apoptose tardia (C) e necrose (D) em relação ao controle após 48 horas de tratamento com ORL na linhagem celular ME-180. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de  $n=3$ . Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn. Valores significativos para  $p<0,05$ .

A inibição farmacológica da FASN com ORL promoveu uma redução significativa da viabilidade de células SiHa tratadas com 300  $\mu\text{M}$  e 400  $\mu\text{M}$  de ORL após 48 horas de tratamento (Figura 13A) e um aumento nas taxas de apoptose e apoptose tardia quando comparadas ao controle (Figura. 12B e 12C). As taxas de necrose foram significativamente elevadas nas células SiHa em todas as concentrações utilizadas. Podemos observar ainda que houve um aumento dose-dependente das taxas de apoptose a partir de 200  $\mu\text{M}$  e das taxas de apoptose tardia a partir de 300  $\mu\text{M}$ .

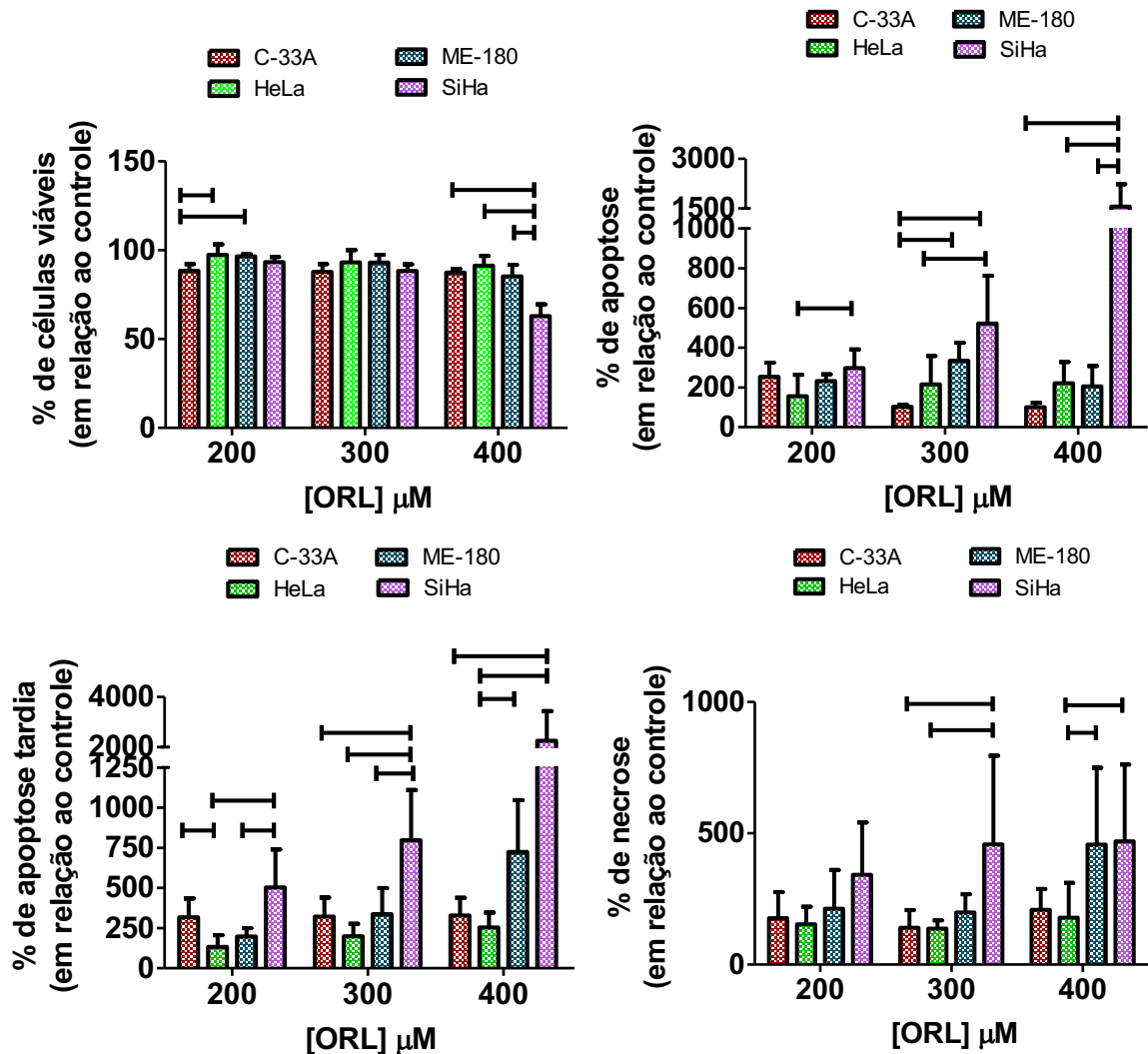


**Figura 13. Citometria de fluxo com dupla marcação para Anexina V e iodeto de propídio.** Análise dos resultados obtidos através da citometria de fluxo revelaram uma redução das células viáveis (A) e aumento das taxas de apoptose (B) apoptose tardia (C) e necrose (D) em relação ao controle após 48 horas de tratamento com ORL na linhagem celular SiHa. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de um  $n=3$ . Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn. Valores significativos para  $p<0,05$ .

A análise comparativa da porcentagem de células viáveis em relação ao controle demonstrou que o tratamento com 200  $\mu\text{M}$  de ORL afetou a linhagem celular C-33A em maior proporção quando comparada com a linhagem HeLa e ME-180 e o tratamento com 400  $\mu\text{M}$  reduziu a viabilidade da linhagem SiHa em maior proporção que as demais células analisadas (Figura 14A).

Os níveis de apoptose (Figura 14B) da linhagem SiHa foram maiores quando comparados aos das HeLa para a concentração de 200  $\mu\text{M}$  e maiores que as linhagens C-33A e HeLa para a concentração de 300  $\mu\text{M}$  de ORL. Ainda, a linhagem SiHa apresentou maiores níveis de apoptose que as demais células na concentração de 400

$\mu\text{M}$  (Fig. 14B). Nas concentrações de 200  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$ , a linhagem ME-180 apresentou maiores taxas de apoptose que a linhagem C-33A (Figura 14B).



**Figura 14. Análise comparativa dos resultados da citometria de fluxo com dupla marcação para Anexina V e iodeto de propídio entre as linhagens C-33A, HeLa, ME-180 e SiHa.** As análises comparativas entre as linhagens revelaram que de um modo geral, os níveis de apoptose e apoptose tardia da linhagem SiHa tratadas com 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  e 400  $\mu\text{M}$  de ORL foram maiores quando comparado com as demais linhagens celulares. Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

Na Figura 14C, podemos observar que os níveis de apoptose tardia da linhagem SiHa tratadas com 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  e 400  $\mu\text{M}$  de ORL foram maiores quando comparado com as demais linhagens celulares. Na figura 14D, os índices de necrose não foram



significativamente diferentes entre as linhagens celulares tratadas com 200  $\mu\text{M}$  de ORL. Para a concentração de 300  $\mu\text{M}$ , a linhagem SiHa apresentou um aumento dos níveis de necrose quando comparadas com as linhagens HeLa e C-33A. Com relação ao tratamento na concentração de 400  $\mu\text{M}$  de ORL, observamos que a linhagem SiHa obteve uma população de células necróticas maiores que da HeLa. Já a linhagem ME-180 obteve maiores taxas de necrose quando comparada com a linhagem HeLa.

## 5. DISCUSSÃO

Células tumorais sintetizam a maior parte dos ácidos graxos que necessitam através da síntese *de novo* de ácido graxos (Medes et al., 1953; Swinnen et al., 2003). Por sua vez, os ácidos graxos são transformados em lipídios de membrana, fornecem energia e podem estimular vias de sinalização.

Como principal enzima da síntese *de novo*, encontramos a ácido graxo-sintase (FASN), responsável por produzir palmitato através da condensação de malonil-CoA e acetil-CoA (Little & Kridel, 2008). A FASN encontra-se em baixa expressão na maioria dos tecidos normais e em elevada expressão em tecidos tumorais (Kuhajda, 2000). Ainda, estudos onde a FASN foi inibida, mostraram uma redução na proliferação, parada no ciclo celular e morte por apoptose (Lupu & Menendez, 2006).

Neste trabalho, foi investigado a expressão da FASN, bem como os efeitos de sua inibição, em diferentes células de câncer de colo de útero. Para tanto, foi utilizado a droga orlistate (ORL), já conhecida por causar diminuição na viabilidade celular e morte por apoptose em câncer de mama, leucemia, linfoma, melanoma e câncer colorretal (Carvalho et al., 2008; Chuang, Chang, & Hwang, 2011; Grube et al., 2014; Kridel et al., 2004; Pallasch et al., 2008). Ainda, o ORL foi capaz de reduzir o desenvolvimento de tumores em modelos xenográficos ou ortotópicos de melanoma, câncer de mama e carcinoma espinocelular oral (Carvalho et al., 2008; Kridel et al., 2004). Contudo, até o momento, nenhum estudo foi publicado associando a presença da FASN com o desenvolvimento do câncer de colo de útero ou os efeitos promovidos pelo ORL.

Assim como já descrito para outras neoplasias, nossos resultados indicam que a inibição da FASN pelo ORL foi capaz de diminuir a proliferação celular e causar apoptose nas linhagens de câncer cervical humano C-33A, HeLa, ME-180 e SiHa. No entanto, as linhagens SiHa e HeLa, que apresentaram uma maior expressão de FASN, também mostraram uma maior redução na proliferação celular quando comparadas com as linhagens C-33A e ME-180. Entre todas as linhagens estudadas a que apresentou menor expressão de FASN foi a linhagens ME-180, que foi também a célula com menor redução na proliferação celular. Ainda, a linhagem SiHa, foi a que apresentou maior porcentagem de células apoptóticas em todas as concentrações de ORL utilizadas. Também foi

possível verificar que a diminuição na viabilidade ocorreu por apoptose e não por necrose, visto que, a porcentagem de células em necrose foi baixa em todas as linhagens, após o tratamento com ORL.

Contudo, até o momento o mecanismo pelo qual a inibição da FASN retarda o desenvolvimento de neoplasias não foi totalmente esclarecido. Alguns estudos sugerem que ao inibir a FASN ocorra uma diminuição na disponibilidade de fosfatidilcolina, um dos principais lipídios afetados pela modulação da FASN, causando a escassez de fosfolipídios necessários para sintetizar a membrana celular de novas células (Lupu & Menendez, 2006). Também, foi proposto que a inibição da FASN levaria a um acúmulo de malonil-CoA, com consequente inibição da carnitina-palmitoil transferase I, que por sua vez levaria ao acúmulo de ceramida e indução dos genes pró-apoptóticos BNIP3, TRAIL e DAPK2 (Bandyopadhyay et al., 2006; Pizer et al., 2000). Além disso, uma grande quantidade de fosfolipídios é necessária durante a fase G1 e S do ciclo celular e consequentemente, o bloqueio da FASN levaria a uma alteração da replicação do DNA, causando assim uma parada no ciclo celular antes da fase G1 (Zhou et al., 2003).

Recentemente, estudos tem ligado a FASN com a replicação viral e entrada do vírus na célula hospedeira. Yang e colaboradores, foram os primeiros a mostrar que a expressão da FASN está aumentada na infecção pelo vírus da hepatite C e que sua presença facilitaria a replicação viral (Yang et al., 2008). Outro estudo realizado com pacientes infectados pelo HIV, observou que a concentração de FASN no plasma desses pacientes era significativamente maior quando comparado com pacientes não infectados (Aragones et al., 2010). Ainda, estudos posteriores têm relacionado a FASN com a infecção pelo vírus da Dengue, Hepatite B e pelo vírus sincicial respiratório (Heaton et al., 2010; Ohol, Wang, Kemble, & Duke, 2015; Zhang et al., 2013). No entanto, nenhum estudo foi publicado correlacionando a expressão da FASN e a infecção pelo papilomavírus humano (HPV).

O HPV infecta as células da camada basal do epitélio uterino, causando uma instabilidade genética das células infectadas, que pode gerar lesões intraepiteliais. Essas lesões, algumas vezes, quando não diagnosticadas e tratadas podem progredir e gerar o câncer de colo de útero (Ostor, 1993). A primeira fase do câncer de colo de útero é chamada de carcinoma *in situ* (McCredie et al., 2008). Nesta fase as células cancerígenas

ficam limitadas à camada superficial do epitélio, local onde ainda não há grande vascularização e oxigenação (INCA, 2012). Além disso, em condições de hipóxia, grandes quantidades de lactato são produzidas pela glicólise aeróbica, prejudicando a cadeia respiratória. A FASN por sua vez tem a capacidade de realizar um balanço redox ao consumir NADPH em excesso, favorecendo a respiração oxidativa (Hochachka, Rupert, Goldenberg, Gleave, & Kozlowski, 2002). Outra vantagem que a presença da FASN fornece é a possibilidade dos ácidos graxos necessários para produzir fosfolípidios de membrana serem produzidos diretamente pelas células neoplásicas, não necessitando de um aporte sanguíneo para o fornecimento de lipídeos exógenos. Essas vantagens fornecem as células tumorais uma maior capacidade de proliferação e sobrevivência em comparação a células adjacentes (Baron, Migita, Tang, & Loda, 2004). Por isso, a ativação da FASN em lesões pré-malignas e em fases iniciais do câncer de colo de útero pode representar uma estratégia para suprir as necessidades lipídicas e gerar o equilíbrio redox requeridos pelas células (Menendez, Colomer, & Lupu, 2005).

Os dados da literatura que correlacionam a infecção pelo HPV e os níveis de FASN são escassos. O presente trabalho, demonstrou pela primeira vez que diferentes linhagens celulares de câncer cervical humano expressam FASN de forma diferencial, e podem ser afetadas por sua inibição farmacológica. Além disso, as células SiHa que são infectadas pelo HPV16, parecem ser mais sensíveis a inibição farmacológica da FASN com o ORL, quando comparada com as demais linhagens celulares. Cabe ressaltar que a infecção pelo HPV16 é uma das mais comumente associadas ao desenvolvimento do câncer cervical humano e a linhagem SiHa é, dentre as linhagens estudadas, a que têm maiores níveis de FASN. Além disso, quando inoculada em camundongos nude, esta linhagem resulta em tumores pouco diferenciados grau 3, mais agressivos que os tumores promovidos pela linhagem ME-180 (infectada pelo HPV 68), que resulta em tumores bem diferenciados (ATCC, 2016).

## **6. CONCLUSÕES**

O presente trabalho, demonstrou pela primeira vez que diferentes linhagens celulares de câncer de colo de útero, infectadas ou não pelo vírus HPV, expressam FASN de forma desigual e podem ser afetadas pela inibição farmacológica da mesma com ORL. Estes resultados indicam que a FASN pode ser importante para a manutenção da proliferação das linhagens celulares SiHa, HeLa, C-33A e ME-180. Ainda, estudos adicionais são necessários para auxiliar o entendimento dos mecanismos causados pela inibição da FASN e na caracterização desta enzima como um alvo terapêutico para câncer de colo de útero.

## 7. REFERÊNCIAS

ATCC: The Global Bioresource Center (2016). SiHa. Disponível em: < <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-35.aspx>> Acesso em: 27 out. 2016.

ATCC: The Global Bioresource Center (2016). ME-180. Disponível em: < <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-33.aspx>> Acesso em: 27 out. 2016.

Agostini, M., Almeida, L. Y., Bastos, D. C., Ortega, R. M., Moreira, F. S., Seguin, F., . . . Graner, E. (2014). The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces the growth and metastasis of orthotopic tongue oral squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther*, 13(3), 585-595. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-1136

Aragones, G., Alonso-Villaverde, C., Oliveras-Ferraros, C., Beltran-Debon, R., Rull, A., Rodriguez-Sanabria, F., . . . Joven, J. (2010). Infection with HIV and HCV enhances the release of fatty acid synthase into circulation: evidence for a novel indicator of viral infection. *BMC Gastroenterol*, 10, 92. doi:10.1186/1471-230X-10-92

Baker, T. S., Newcomb, W. W., Olson, N. H., Cowser, L. M., Olson, C., & Brown, J. C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*, 60(6), 1445-1456. doi:10.1016/S0006-3495(91)82181-6

Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Wang, Y., Pai, S. K., Hirota, S., Hosobe, S., . . . Watabe, K. (2006). Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res*, 66(11), 5934-5940. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3197

Baron, A., Migita, T., Tang, D., & Loda, M. (2004). Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*, 91(1), 47-53. doi:10.1002/jcb.10708

Brusselmans, K., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2003). 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*, 106(6), 856-862. doi:10.1002/ijc.11317

Carvalho, M. A., Zecchin, K. G., Seguin, F., Bastos, D. C., Agostini, M., Rangel, A. L., . . . Graner, E. (2008). Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer*, 123(11), 2557-2565. doi:10.1002/ijc.23835

Chajes, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G. M., & Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res*, 66(10), 5287-5294. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1489

Chirala, S. S., & Wakil, S. J. (2004). Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*, 39(11), 1045-1053.

Chuang, H. Y., Chang, Y. F., & Hwang, J. J. (2011). Antitumor effect of orlistat, a fatty acid synthase inhibitor, is via activation of caspase-3 on human colorectal carcinoma-bearing animal. *Biomed Pharmacother*, 65(4), 286-292. doi:10.1016/j.biopha.2011.02.016

Coleman, D. T., Bigelow, R., & Cardelli, J. A. (2009). Inhibition of fatty acid synthase by luteolin post-transcriptionally down-regulates c-Met expression independent of proteosomal/lysosomal degradation. *Mol Cancer Ther*, 8(1), 214-224. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0722

Costello, L. C., & Franklin, R. B. (2005). 'Why do tumour cells glycolyse?': from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem*, 280(1-2), 1-8.

Darnell, G. A., Schroder, W. A., Antalis, T. M., Lambley, E., Major, L., Gardner, J., . . . Suhrbier, A. (2007). Human papillomavirus E7 requires the protease calpain to degrade the retinoblastoma protein. *J Biol Chem*, 282(52), 37492-37500. doi:10.1074/jbc.M706860200

de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033

Denny, L., Herrero, R., Levin, C., & Kim, J. J. (2015). Cervical Cancer. In H. Gelband, P. Jha, R. Sankaranarayanan, & S. Horton (Eds.), *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington (DC).

Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P. L., & Loda, M. (2010). Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*, 6(4), 551-562. doi:10.2217/fon.10.11

Ghaffari, P., Mardinoglu, A., & Nielsen, J. (2015). Cancer Metabolism: A Modeling Perspective. *Front Physiol*, 6, 382. doi:10.3389/fphys.2015.00382

Ghittoni, R., Accardi, R., Chiocca, S., & Tommasino, M. (2015). Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedicalscience*, 9, 526. doi:10.3332/ecancer.2015.526

Grube, S., Dunisch, P., Freitag, D., Klausnitzer, M., Sakr, Y., Walter, J., . . . Ewald, C. (2014). Overexpression of fatty acid synthase in human gliomas correlates with the WHO tumor grade and inhibition with Orlistat reduces cell viability and triggers apoptosis. *J Neurooncol*, 118(2), 277-287. doi:10.1007/s11060-014-1452-z

Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., . . . Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*, 8(4), 311-321. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.008

Heaton, N. S., Perera, R., Berger, K. L., Khadka, S., Lacount, D. J., Kuhn, R. J., & Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(40), 17345-17350. doi:10.1073/pnas.1010811107

Hochachka, P. W., Rupert, J. L., Goldenberg, L., Gleave, M., & Kozlowski, P. (2002). Going malignant: the hypoxia-cancer connection in the prostate. *Bioessays*, *24*(8), 749-757. doi:10.1002/bies.10131

Instituto Nacional de Câncer – INCA. (2016). O que é o câncer? Disponível em: < <http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso em: 27 out. 2016.

Instituto Nacional de Câncer – INCA. (2016). Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 27 out. 2016.

Instituto Nacional de Câncer – INCA. (2012). ABC do Câncer: Abordagens Básicas para controle do câncer. 2.e.d. Rio de Janeiro: INCA, 2012

International Agency for Research on Cancer. (2014). World Cancer Report 2014. Disponível em: <<http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>>. Acesso em: 27 out. 2016.

International Agency for Research on Cancer. (2012). Globocan 2012. Disponível em: < [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) >. Acesso em: 27 out. 2016.

Jayakumar, A., Tai, M. H., Huang, W. Y., al-Feel, W., Hsu, M., Abu-Elheiga, L., . . . Wakil, S. J. (1995). Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(19), 8695-8699.

Knowles, L. M., Axelrod, F., Browne, C. D., & Smith, J. W. (2004). A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem*, *279*(29), 30540-30545. doi:10.1074/jbc.M405061200

Kridel, S. J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N., & Smith, J. W. (2004). Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*, *64*(6), 2070-2075.

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

Kuhajda, F. P., Pizer, E. S., Li, J. N., Mani, N. S., Frehywot, G. L., & Townsend, C. A. (2000). Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(7), 3450-3454. doi:10.1073/pnas.050582897

Li, J. N., Gorospe, M., Chrest, F. J., Kumaravel, T. S., Evans, M. K., Han, W. F., & Pizer, E. S. (2001). Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res*, *61*(4), 1493-1499.



- Little, J. L., & Kridel, S. J. (2008). Fatty acid synthase activity in tumor cells. *Subcell Biochem*, 49, 169-194. doi:10.1007/978-1-4020-8831-5\_7
- Liu, H., Liu, J. Y., Wu, X., & Zhang, J. T. (2010). Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *Int J Biochem Mol Biol*, 1(1), 69-89.
- Lupu, R., & Menendez, J. A. (2006). Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Curr Pharm Biotechnol*, 7(6), 483-493.
- Maier, T., Jenni, S., & Ban, N. (2006). Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science*, 311(5765), 1258-1262. doi:10.1126/science.1123248
- Maier, T., Leibundgut, M., & Ban, N. (2008). The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science*, 321(5894), 1315-1322. doi:10.1126/science.1161269
- McCredie, M. R., Sharples, K. J., Paul, C., Baranyai, J., Medley, G., Jones, R. W., & Skegg, D. C. (2008). Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*, 9(5), 425-434. doi:10.1016/S1470-2045(08)70103-7
- Medes, G., Thomas, A., & Weinhouse, S. (1953). Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res*, 13(1), 27-29.
- Menendez, J. A., Colomer, R., & Lupu, R. (2005). Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? *Med Hypotheses*, 64(2), 342-349. doi:10.1016/j.mehy.2004.07.022
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(10), 763-777. doi:10.1038/nrc2222
- Mullen, G. E., & Yet, L. (2015). Progress in the development of fatty acid synthase inhibitors as anticancer targets. *Bioorg Med Chem Lett*, 25(20), 4363-4369. doi:10.1016/j.bmcl.2015.08.087
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., . . . International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study, G. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348(6), 518-527. doi:10.1056/NEJMoa021641
- Ohol, Y. M., Wang, Z., Kemble, G., & Duke, G. (2015). Direct Inhibition of Cellular Fatty Acid Synthase Impairs Replication of Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viruses. *PLoS One*, 10(12), e0144648. doi:10.1371/journal.pone.0144648

Orita, H., Coulter, J., Lemmon, C., Tully, E., Vadlamudi, A., Medghalchi, S. M., . . . Gabrielson, E. (2007). Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 13(23), 7139-7145. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1186

Ostor, A. G. (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*, 12(2), 186-192.

Pallasch, C. P., Schwamb, J., Konigs, S., Schulz, A., Debey, S., Kofler, D., . . . Wendtner, C. M. (2008). Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 22(3), 585-592. doi:10.1038/sj.leu.2405058

Pizer, E. S., Chrest, F. J., DiGiuseppe, J. A., & Han, W. F. (1998). Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res*, 58(20), 4611-4615.

Pizer, E. S., Jackisch, C., Wood, F. D., Pasternack, G. R., Davidson, N. E., & Kuhajda, F. P. (1996). Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 56(12), 2745-2747.

Pizer, E. S., Thupari, J., Han, W. F., Pinn, M. L., Chrest, F. J., Frehywot, G. L., . . . Kuhajda, F. P. (2000). Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res*, 60(2), 213-218.

Rendina, A. R., & Cheng, D. (2005). Characterization of the inactivation of rat fatty acid synthase by C75: inhibition of partial reactions and protection by substrates. *Biochem J*, 388(Pt 3), 895-903. doi:10.1042/BJ20041963

Seguin, F., Carvalho, M. A., Bastos, D. C., Agostini, M., Zecchin, K. G., Alvarez-Flores, M. P., . . . Graner, E. (2012). The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. *Br J Cancer*, 107(6), 977-987. doi:10.1038/bjc.2012.355

Smith, J. S., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R., & Clifford, G. M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*, 121(3), 621-632. doi:10.1002/ijc.22527

Swinnen, J. V., Van Veldhoven, P. P., Timmermans, L., De Schrijver, E., Brusselmans, K., Vanderhoydonc, F., . . . Verhoeven, G. (2003). Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*, 302(4), 898-903.

Van de Sande, T., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2002). Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, 62(3), 642-646.

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., . . . Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189(1), 12-19. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F

Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 269-270.

Weiss, L., Hoffmann, G. E., Schreiber, R., Andres, H., Fuchs, E., Korber, E., & Kolb, H. J. (1986). Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 367(9), 905-912.

White, E. A., Kramer, R. E., Tan, M. J., Hayes, S. D., Harper, J. W., & Howley, P. M. (2012). Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity. *J Virol*, 86(24), 13174-13186. doi:10.1128/JVI.02172-12

World Health Organization, 2015. Cancer, Disponível em: < <http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso em: 27 out. 2016.

World Health Organization, 2016. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>>. Acesso em: 27 out. 2016.

Wu, X., Qin, L., Fako, V., & Zhang, J. T. (2014). Molecular mechanisms of fatty acid synthase (FASN)-mediated resistance to anti-cancer treatments. *Adv Biol Regul*, 54, 214-221. doi:10.1016/j.jbior.2013.09.004

Yang, W., Hood, B. L., Chadwick, S. L., Liu, S., Watkins, S. C., Luo, G., . . . Wang, T. (2008). Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology*, 48(5), 1396-1403. doi:10.1002/hep.22508

Zhang, H., Li, H., Yang, Y., Li, S., Ren, H., Zhang, D., & Hu, H. (2013). Differential regulation of host genes including hepatic fatty acid synthase in HBV-transgenic mice. *J Proteome Res*, 12(6), 2967-2979. doi:10.1021/pr400247f

Zhou, W., Simpson, P. J., McFadden, J. M., Townsend, C. A., Medghalchi, S. M., Vadlamudi, A., . . . Kuhajda, F. P. (2003). Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res*, 63(21), 7330-7337.

zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2(5), 342-350. doi:10.1038/nrc798

