



ESTÊVÃO AZEVEDO MELO

**ANÁLISE DO EFEITO DO INIBIDOR DE FASN ORLISTAT
SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-10, IL-12, IFN- γ E TGF- β EM
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10**

**PIRACICABA
2015**



UNICAMP

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

ESTÊVÃO AZEVEDO MELO

**ANÁLISE DO EFEITO DO INIBIDOR DE FASN ORLISTAT
SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-10, IL-12, IFN- γ E TGF- β EM
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10**

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

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno, e orientada pelo Prof. Dr. Edgard Graner.

Assinatura do Orientador

**PIRACICABA
2015**

Agência de fomento: CNPq
Nº processo: 370824/2012-1

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

M491a Melo, Estêvão Azevedo, 1989-
Análise do efeito inibidor de FASN orlistat sobre a produção de IL-10, IL-12, IFN-G e TGF-B em células de melanoma murino B16-F10 / Estêvão Azevedo Melo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2015.

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

1. Ácido graxo sintases. 2. Orlistate. 3. Melanoma. 4. Sistema imunológico. 5. Citocinas. I. Graner, Edgard, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of inhibitor effect of fasn orlistat on the production of IL-10, IL-12, IFN-G and TGF-B in murine melanoma B16-F10 cell

Palavras-chave em inglês:

Fatty acid synthases

Orlistat

Melanoma

Immune system

Cytokines

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Edgard Graner [Orientador]

Ricardo Della Coletta

Débora Campanella Bastos

Data de defesa: 03-07-2015

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 03 de Julho de 2015, considerou o candidato ESTÊVÃO AZEVEDO MELO aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Edgard Graner".

Prof. Dr. EDGARD GRANER

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Bastos".

Profa. Dra. DÉBORA CAMPANELLA BASTOS

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ricardo Della Coletta".

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

RESUMO

A ácido graxo sintase (FASN) é a enzima responsável pela biossíntese endógena de ácidos graxos e apontada como uma oncoproteína metabólica, por favorecer a proliferação e sobrevivência das células tumorais nas quais sua expressão é elevada. Vários são os compostos capazes de inibir a atividade de FASN, dentre eles o orlistat (Xenical®), que possui efeitos antiproliferativos previamente mostrados em células de câncer de mama, próstata, boca e melanoma. O sistema imunológico apresenta um importante papel na prevenção e defesa do organismo contra neoplasias malignas. As células do sistema imune que se infiltram nos melanomas são produtoras de uma vasta gama de citocinas, dentre elas interleucina 12 (IL-12) e interferon gama (IFN- γ) que favorecem uma resposta imune bem sucedida contra os tumores, porém, as células dos melanomas possuem capacidade de produzir interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β), capazes de inibir as células imunocompetentes, favorecendo a progressão tumoral e disseminação metastática. O objetivo deste estudo foi avaliar a secreção das citocinas IL-10, IL-12, IFN- γ e TGF- β pelas células de melanoma murino B16-F10 após tratamento com orlistat. Para isto, inicialmente determinou-se a dosagem de orlistat capaz de inibir a proliferação celular em 50% (IC₅₀). Em seguida, as células foram tratadas por 24 e 48 horas, quando realizou-se a quantificação da secreção das citocinas por ELISA. Após 24 horas de tratamento, observou-se aumento da secreção de IL-10 e IL-12, no entanto, após 48 horas de tratamento não foi detectada diferenças estatisticamente significantes na secreção de ambas as citocinas, quando comparadas aos seus controles. IFN- γ e TGF- β não foram detectáveis. Assim, os resultados desta pesquisa mostram que o tratamento com orlistat alterou a produção das citocinas IL-10 e IL-12, sugerindo que o tratamento promove um equilíbrio entre estas citocinas pró e anti-inflamatórias nas células estudadas.

Palavras chave: Ácido graxo sintase.Orlistat.Melanoma.Sistema imunológico.Citocinas.

ABSTRACT

Fatty acid synthase (FASN) is the enzyme responsible for the endogenous biosynthesis of fatty acids suggested as a metabolic oncoprotein by promoting proliferation and survival of cancer cells. Several compounds are known to inhibit FASN activity, including orlistat (Xenical®), which has antiproliferative effects in breast, prostate, and oral cancer as well as melanoma cells. Melanoma is an aggressive malignant tumor of melanocytes with high propensity for metastatic spread and resistant to chemotherapy. The immune system plays an important role in the prevention and defense against malignant neoplasms. In fact, immune cells that infiltrate melanomas produce a wide range of cytokines, such as interleukin 12 (IL-12) and interferon gamma (IFN- γ), which favor a successful immune response against the tumor. However, melanomas cells are able to produce interleukin 10 (IL-10) and transforming growth factor beta (TGF- β) and in turn inhibit immunocompetent cells, favoring tumor progression and metastatic spread. The aim of this research was to evaluate the effect of the FASN inhibitor orlistat on the secretion of the cytokines IL-10, IL-12, IFN- γ and TGF- β by B16-F10 mouse melanoma cells. For this purpose, we first searched for the IC₅₀ Of orlistat in B16-F10 cells. Then, cells were treated for 24 and 48 hours with the drug and the secretion of cytokines quantified by ELISA. After 24 hours of treatment the secretion of IL-10 and IL-12 was increased, however, after 48 hours there were no statistically significant changes in the secretion of both cytokines, compared to their controls. IFN- γ and TGF- β were not detectable. Thus, the results of this study show that the treatment with orlistat change the production of IL-10 and IL-12, suggesting a balance between the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Fatty acid synthase .Orlistat.Melanoma. Immune system.Cytokines.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
EPÍGRAFE.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3 PROPOSIÇÃO.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5 RESULTADOS.....	21
6 DISCUSSÃO.....	27
7 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

DEDICATÓRIA

Á minha família, sempre ao meu lado com todo o carinho e suporte em cada momento de mais esta etapa da minha peregrinação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que através de seu filho Jesus, me concedeu alegrias vividas e pela oportunidade de amadurecer e ter meu caráter moldado.

Ao meu orientador, professor doutor Edgard Graner, pelo exemplo de profissional dedicado ao trabalho e à família, trabalhando com zelo diário e buscando sempre qualidade e pela sabedoria demonstrada durante o tempo de orientação.

À Luciana Yamamoto, um agradecimento especial que vai além do que palavras registradas podem expressar. Agradeço com carinho pela amizade e pelo exemplo de dedicação à profissão, trabalhando incansavelmente e com excelência, sempre correndo atrás de seus objetivos de forma honesta. Com paciência e esmero, conduziu-me dos passos iniciais ao fim do mestrado.

À Fernanda Moreira, pela amizade, ensinamentos, toda a paciência e suporte durante o decorrer do mestrado, sem o qual este trabalho não seria concluído. Registro aqui minha gratidão de coração.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques.

À professora doutora professora doutora Cíntia Pereira Machado Tabchoury, coordenadora da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

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

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

Aos profissionais do Laboratório de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, Fábio Haach Téó, Fabiana Facco Casarotti, Luana Ganhor por toda colaboração.

À Dra. Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, pelo tempo doado ao instruir diversos experimentos e toda sua simpatia e tranquilidade, trazendo sorrisos enquanto se dedica e dá o melhor de si em seu trabalho.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia: Alicia Rumayor, Ana Carolina, Ana Camila, Andréia Bufallino, Camilla Borges, Carine Oliveira, Carolina Carneiro, Elizabete Bagordakis, Felipe Paiva, Florence Cuadra, Isadora Luana, José Laurentino, Karina Moraes, Katya Pulido, Lara Ramos, Yamamoto, Marcondes Sena, Marisol Martinez, Nathalia Lima, Priscila Campioni, Rebeca Barros, Renato Assis, Rose Ortega, Sabrina Nogueira, Sibebe Aquino, Vinicius Rabelo, Wagner Gomes e Wilfredo Alejandro.

Às preciosas amigadas que fiz neste tempo em Piracicaba.

À CNPq (Processo 370824/2012-1) pela concessão da bolsa de mestrado.

EPÍGRAFE

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP: *Acyl carrier protein* - proteína transportadora de acil

ADCC: *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* - citotoxicidade celular dependente de anticorpos

APC: *Antigen-presenting cell* - Célula apresentadora de antígeno

CD: Célula dendrítica

CI: *Combination index* - Índice de combinação

COX: Ciclooxygenase

CTL: Linfócitos T Citotóxicos

DMSO: Dimetil sulfóxido

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

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FASN: *Fatty acid synthase* - Ácido graxo sintase

FBS: *Fetal Bovine Serum* - Soro fetal bovino

FGF: *Fibroblast Growth Factor* - Fator de Crescimento de Fibroblastos

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

IFN: *Interferon*

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IL: *Interleucina*

JAK: Janus kinase

kDa: *Kilodalton* - Quilodaltons

LTCD4⁺: Linfócito T CD4⁺

LTCD8⁺: Linfócito T CD8⁺

LTreg: Linfócito T regulador

MDSC: *Myeloid-derived suppressor cells* - Células supressoras derivadas mielóides

MHC: *Major Histocompatibility complex* - Complexo Maior de Histocompatibilidade

MMP-9: Matrix metalloproteinase 9 - Metaloproteínases da matriz

MTT: 3 - (4,5-dimetil-2-yl) -2,5 difenilitertrazolim brometo

NADH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* - Nicotinamida adeninadinucleotídeo fosfato

NK: *Natural Killer*

PAF: *Platelet-activating factor* - Fator de ativação de plaquetas

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

RPMI: Roswell Park Memorial Institute *Medium*

SCC: *Squamous cell carcinoma* - Carcinoma de Células Escamosas

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription* - transdutores de sinal e ativadores de transcrição

TGF: *Transforming growth factors*- Fator de crescimento transformante

Th: Linfócitos T auxiliares

TNF: *Tumor necrosis factor* - Fator de necrose tumoral

UV: Ultravioleta

VEGFA: Vascular endothelial growth factor -

xg: Força centrífuga

1 INTRODUÇÃO

A ácido graxo sintase (FASN) é a enzima responsável pela biossíntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos precursores malonil-CoA e acetil-CoA (Baron *et al.*, 2004, Flavin *et al.*, 2010). Em células normais, exceto aquelas pertencentes a tecidos altamente lipogênicos como fígado, tecido adiposo, glândula mamária durante a lactação e endométrio na fase proliferativa, há pouca atividade de FASN e a maior parte dos ácidos graxos utilizados provém da dieta (Kuhajda *et al.*, 2000). Recentemente, FASN foi apontada como uma oncoproteína metabólica, devido a sua habilidade em favorecer o crescimento e sobrevivência das células tumorais (Flavin *et al.*, 2010). De fato, sua expressão é bastante elevada em diversos tipos de neoplasias malignas, como os cânceres de mama (Bershtein *et al.*, 2009), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000), próstata (Rossi *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2006), carcinoma espinocelular oral (Silva *et al.*, 2004) e também melanomas (de Andrade *et al.*, 2011).

Vários são os compostos capazes de inibir a atividade de FASN, dentre eles estão cerulenina, c75 e orlistat. Cerulenina e c75 bloqueiam a síntese de DNA e causam apoptose em linhagens celulares derivadas de diferentes tumores malignos (Pizer *et al.*, 1998a; Kuhajda *et al.*, 2000; Alli *et al.*, 2005). O orlistat (tetrahidrolipstatin, comercializado pela Roche como Xenical®) é usado no tratamento da obesidade por inibir de forma irreversível a ação de lipases gástricas e pancreáticas (Guercioli *et al.*, 1997). Posteriormente, sua atividade como potente inibidor da atividade de FASN atuando através da formação de adutos covalentes com o domínio tioesterase foi evidenciada (Kridel *et al.*, 2004; Flavin *et al.*, 2010). Assim como cerulenina e c75, orlistat também tem importantes efeitos anti-proliferativos, demonstrados em células de câncer de mama, próstata, carcinoma espinocelular oral e melanomas (Menendez *et al.*, 2004, Agostini *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008).

O melanoma resulta da transformação maligna dos melanócitos cutâneos, células que produzem o pigmento natural da pele melanina, localizados na camada basal do epitélio. Esta neoplasia ocorre principalmente em adultos brancos com história prévia de exposição à radiação ultravioleta (UV) (Neville *et al.*, 2009). Aproximadamente 90% das lesões acometem a pele, porém podem ocorrer na mucosa oral, esôfago, meninges e também na conjuntiva (Kiecker *et al.*, 2007; Femiano *et al.*, 2008; Guevara-Canales *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2011; Spagnolo *et al.*, 2012;). O melanoma é conhecido pelo seu comportamento clínico agressivo, alta propensão para emissão de metástases e resistência ao tratamento quimioterápico, sendo considerado um grave problema de saúde pública em todo o mundo, inclusive no Brasil (INCA, 2014; Aris & Barrio, 2015). Quando o diagnóstico é tardio e a doença se apresenta em estágio avançado, com metástases, o tratamento é pouco efetivo e as chances de cura escassas (Finn *et al.*, 2012; Livingstone *et al.*, 2012). O tratamento para os melanomas consiste na remoção cirúrgica do tumor com margens de segurança, associada à imunoterapia, quimioterapia e/ou radioterapia nas lesões invasivas. Nos últimos, anos o tratamento para o melanoma tem mostrado alguns avanços, como terapias específicas para vias oncogênicas e ativação do sistema imunológico (Aris & Barrio, 2015).

O sistema imunológico apresenta um importante papel na identificação, prevenção e defesa do organismo contra neoplasias malignas (Coussens & Werb, 2002). O microambiente tumoral não é formado apenas por células neoplásicas, mas por vários outros tipos de célula, incluindo as do sistema imune (Holen *et al.*, 2011; Quail *et al.*, 2013). Nos melanomas, as células do sistema imune que se infiltram no tumor são capazes de produzir uma vasta gama de citocinas, que são proteínas responsáveis por enviar sinais estimulantes, modulatórios ou inibitórios para diversas células do sistema imunológico, favorecendo o desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral ou uma atividade imunossupressora, permitindo a progressão tumoral e sua disseminação metastática (Varella & Forte, 2001; revisado por Ilkovitch & Lopes, 2008).

Diante do exposto, tendo em vista que a elevada expressão de FASN está associada à agressividade tumoral e desenvolvimento de metástases, este estudo teve como objetivo avaliar a produção das citocinas interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e interferon gama (IFN- γ) por células de melanoma murino B16-F10 tratadas com o inibidor de FASN orlistat.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enzima Ácido Graxo Sintase (Fatty Acid Synthase – FASN)

Alterações no metabolismo de células malignas humanas tem sido reconhecidas desde os anos 1920, com a observação do aumento da glicólise anaeróbica nestas células (Kuhajda *et al.*, 2006). Muitos tipos de neoplasias malignas apresentam fenótipo lipogênico, onde suas células necessitam de um fornecimento extra de ácidos graxos para proliferação e sobrevivência (Kuemmerle *et al.*, 2011). Os ácidos graxos são constituintes essenciais das membranas biológicas e importantes substratos para o metabolismo energético, para acilação de proteínas e para os mecanismos de transdução de sinais e de regulação da expressão gênica (Menendez & Lupu, 2007). As principais fontes de ácidos graxos para o metabolismo animal são a dieta e a síntese endógena através da enzima ácido graxo sintase (FASN). Apesar das células malignas aparentemente darem preferência à segunda, possuem capacidade de obter ácidos graxos pré-formados derivados da dieta por absorção na corrente sanguínea (Menendez & Lupu, 2007; Kuemmerle *et al.*, 2011).

Estruturalmente, em mamíferos, FASN é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas multifuncionais, com massa molecular de 250-270 kDa, contendo em cada cadeia sete sítios catalíticos e um sítio para a proteína transportadora de acil (ACP). Estes sítios são, em ordem linear a partir da extremidade amino terminal em direção à carboxil terminal, β -cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transferases, β -hidroxiacil desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase, ACP e tioesterase, que atuam em sequência para a liberação do ácido graxo recém-sintetizado (Smith *et al.*, 2003; Flavin *et al.*, 2010). FASN catalisa a síntese do ácido graxo saturado palmitato a partir da condensação dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA, utilizando nicotinamida adeni na dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como cofator, exercendo um papel central na homeostase de energia através da conversão do excesso de carbono em

ácidos graxos para armazenamento (Baron *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Migita *et al.*, 2009, Flavin *et al.*, 2010).

FASN é importante em diversos processos biológicos, dentre os quais o armazenamento de energia, produção de ácidos graxos durante a lactação, síntese de membranas celulares, manutenção do ciclo endometrial em fase proliferativa e produção da substância surfactante nos pulmões de fetos em desenvolvimento (Kuhajda *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2004). Entretanto, sua expressão é baixa na maioria dos tecidos normais, com exceção do fígado, tecido adiposo e glândulas mamárias, pois a maior parte dos ácidos graxos usados pelas células provém da dieta (Menendez & Lupu, 2007; Flavin *et al.*, 2010). Por outro lado, em células malignas os ácidos graxos são sintetizados em grande quantidade para a formação das membranas, produção de energia através da β -oxidação e modificações lipídicas em proteínas (Flavin *et al.*, 2010). Alta expressão de FASN foi descrita nos cânceres de mama (Li *et al.*, 2008; Bershtein *et al.*, 2009), próstata (Rossi *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2006), ovário Wang *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2010), endométrio (Sebastiani *et al.*, 2004), esôfago (Orita *et al.*, 2010), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2006), pulmão (Wang *et al.*, 2002, Visca *et al.*, 2004), bexiga (Visca *et al.*, 2003), nos carcinomas de células renais (Horiguchi *et al.*, 2008), espinocelular oral (Silva *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009), colorretal (Ogino *et al.*, 2009), de pâncreas (Witkiewicz *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011) e da tireoide (Vlad *et al.*, 1999), no mieloma múltiplo (Wang *et al.*, 2008), e nos melanomas de pele e oral (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2011), além dos sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003) e linfomas não-Hodgkin (Uddin *et al.*, 2010).

A regulação da expressão de FASN no câncer é complexa e ocorre na transcrição e após a tradução (Flavin *et al.*, 2010). Na primeira, a via do fator de crescimento epidérmico (EGF), através de EGFR e ErbB2, e a dos hormônios esteroides (estrógeno, progesterona e andrógenos) e seus respectivos receptores (Menendez *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Mashima *et al.*, 2009) se destacam. Nas células tumorais, fatores de crescimento e seus receptores ativam a cascata de

transdução de sinais da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K-AKT) e das quinases regulatórias de sinais extracelulares (ERK1 e ERK2) e MEK (proteína ERK ativada por mitógeno), as quais modulam a expressão de FASN através da expressão ou maturação nuclear das proteínas SREBP1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*) que se ligam ao promotor de FASN. Os hormônios esteroides ligados a seus respectivos receptores podem desencadear mecanismos semelhantes (Menendez & Lupu, 2007; Flavin *et al.*, 2010). A expressão de FASN também pode ser modificada em nível pós-traducional, através da interação com USP2a, isopeptidase que remove ubiquitina de FASN. No câncer de próstata, a enzima USP2a interage com FASN evitando assim que FASN seja degradada pelos proteossomos (Graner *et al.*, 2004).

2.2 Inibidores de FASN

Devido à alta expressão de FASN em tecidos malignos, inibidores farmacológicos desta enzima se tornam ferramentas em potencial para o controle do câncer (Menendez & Lupu, 2007). Dentre eles a cerulenina, seu análogo sintético c75 e orlistat, c93, C247 e FAS31 têm sido bastante estudados (Menendez & Lupu, 2007; Flavin *et al.*, 2010).

A cerulenina ([2R,3S] - 2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida) é um produto do fungo “*Cephalosporium caerulens*” que atua como inibidor da síntese de ácidos graxos bloqueando de maneira irreversível a atividade de FASN no sítio β -cetoacil sintase, onde ocorre a condensação de acetil-CoA e malonil-CoA (Pizer *et al.*, 1996; Kuhajda *et al.*, 2000). Seu uso *in vivo* é limitado, pois é instável devido a presença de um grupo epóxi extremamente reativo (Lupu & Menendez, 2006). C75 é uma pequena molécula sintética, derivada da cerulenina, que apresenta efeitos inibitórios similares porém é estável e tem melhor efeito *in vivo* (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Tanto cerulenina como c75 causam significativa inibição da progressão do ciclo celular, bloqueando a passagem para a fase S em linhagens celulares derivadas de neoplasias

malignas humanas (Pizer *et al.*, 1996; Kuhajda, 2000; Li *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003). A inibição da atividade de FASN causa também aumento na taxa de morte por apoptose em células malignas (Li *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 2004).

Orlistat (tetrahidrolipstatin, comercializado como Xenical) é um derivado semissintético da lipstatina, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da obesidade que inibe a ação das lipases gástricas e pancreáticas (Guerciolini *et al.*, 1997). Seu efeito sobre FASN foi descrito em estudo proteômico em câncer de próstata, o que causa forte inibição da proliferação em várias linhagens de câncer de próstata, bem como redução do crescimento tumoral em modelo animal (Kridel *et al.*, 2004, Flavin *et al.* 2010). Orlistat atua através da formação de adutos covalentes com o domínio tioesterase da enzima FASN, responsável pela liberação do palmitato (Flavin *et al.*, 2010). Dowling *et al.* (2009) mostraram que esta droga aumenta as taxas de apoptose em células de tumores gástricos, além de aumentar a sobrevida de camundongos portadores desta neoplasia. Agostini *et al.* (2014) estudaram os efeitos do orlistat em um modelo murino ortotópico de metástase espontânea de CEC de língua, no qual foi observada redução de 43% no número de linfonodos cervicais metastáticos e aumento no índice apoptótico e da secreção de VEGFA_{165b}.

2.3 Melanoma

O melanoma é uma neoplasia maligna dos melanócitos de pele ou membranas mucosas (Barnes *et al.*, 2005). Esta doença é considerada um problema de saúde pública mundial e sua incidência está aumentando nos últimos 30 anos (Erdei & Torres, 2010; Aris & Barrio, 2015). Por ano, cerca de três milhões de novos casos de câncer de pele são diagnosticados no mundo e o melanoma corresponde a aproximadamente 132 mil destes casos, sendo o terceiro câncer de pele mais comum, o que corresponde a apenas 5% do total (Gray-Schopfer, 2007, Neville *et al.*, 2009). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2014 estimou-se 5.890 novos casos de melanoma, sendo 2.960 em homens e 2.930 em mulheres. O melanoma possui menor incidência em

relação aos demais cânceres de pele, porém é significativamente mais letal (INCA 2014).

O melanoma é observado principalmente em adultos brancos na faixa etária de 50 a 55 anos com história prévia de exposição à radiação UV (Neville *et al.*, 2009). Aproximadamente 90% das lesões acometem a pele, porém podem ocorrer lesões em mucosa oral, no esôfago, meninges e também nos olhos (Kiecker *et al.*, 2007; Femiano *et al.*, 2008; Guevara-Canales *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2011; Spagnolo *et al.*, 2012). O risco para o desenvolvimento do melanoma é de duas a oito vezes maior quando há histórico familiar da lesão. Outros fatores de risco incluem pele e cabelos claros, nevos melanocíticos pré-existent e mutações (Li *et al.*, 2006; Neville *et al.*, 2009).

O acúmulo de mutações em melanócitos resulta em transformação maligna e genes supressores de tumor já foram associados à progressão da doença (Hussein, 2004). Dentre os genes ligados à suscetibilidade para o melanoma incluem *CDKN2A (p16)*, no cromossomo 9p21, responsável pela expressão das proteínas p16^{INK4a} e p14^{ARF}, envolvidas na regulação do ciclo celular (Chin, 2003). Mutações neste gene são responsáveis por cerca de 20% dos casos de melanoma familiar (Tucker & Goldstein, 2003). Outro gene envolvido é o *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13 e responsável pela expressão da ciclina D1 (Utikal *et al.*, 2005). Mutações nos genes que codificam as proteínas da família *ras* e as serina/treonina quinases *raf*, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF/SF) e seu receptor c-MET, assim como as proteínas supressoras de tumor PTEN, p53, p27Kip1 e p21, também já foram descritas (Chin, 2003; Chudnovsky *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

O melanoma é muito conhecido pelo seu comportamento clínico agressivo, alta propensão para emissão de metástases e resistência ao tratamento quimioterápico. Se diagnosticado precocemente, 80% dos casos são curados através da remoção cirúrgica, no entanto, a forma metastática é altamente refratária às terapias atuais, com uma média de sobrevida de 6 meses (Aris & Barrio, 2015). O prognóstico ruim deve-se à disseminação metastática para

o fígado, pulmões, cérebro, ossos, ovário, estômago, pâncreas e intestino delgado (Hawes *et al.*, 2001; Rodolfo *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 2004; Atallah & Flaherty, 2005; Katz *et al.*, 2005; McWilliams *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Belagyi *et al.*, 2006).

O tratamento para o melanoma consiste na remoção cirúrgica do tumor com adequada margem de segurança. Melanomas invasivos ou com comprometimento dos linfonodos podem ser tratados cirurgicamente e associado com imunoterapia, quimioterapia e/ou radioterapia (Aris & Barrio, 2015). Nos últimos cinco anos o tratamento para o melanoma tem mostrado alguns avanços, como terapias específicas para vias oncogênicas e ativação do sistema imunológico. Terapias combinadas tem sido uma estratégia racional e a aprovação de drogas específicas, tais como vemurafenib e dabrafenib e anticorpos monoclonais como ipilimumab e pembrolizumab, trás novas perspectivas para o tratamento do melanoma avançado (Miller *et al.*, 2014, Aris & Barrio, 2015).

2.4 Expressão de FASN em Melanomas

O câncer resulta do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que afetam o crescimento, proliferação e sinalização celular (Scully & Bagan, 2009). As células malignas, diferentemente das normais, sintetizam quantidades substanciais de ácidos graxos, independentemente dos níveis circulantes e adquirem assim vantagens na proliferação, sobrevivência e na resistência à medicamentos (Agostini *et al.*, 2014).

Ho *et al.* (2007) avaliaram a inibição de FASN em células de melanoma humano A-375 com cerulenina e c75 e observaram que a proliferação e a viabilidade celular foram reduzidas após os tratamentos. No mesmo trabalho, os efeitos pró-apoptóticos dos inibidores foram confirmados usando microscopia confocal através de marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídio. Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (Carvalho *et al.*, 2008) mostrou que a inibição de FASN com orlistat reduz a proliferação e causa apoptose na linhagem B16-F10, oriunda de melanoma de camundongo. Os mesmos autores

demonstraram redução de 52% no número de metástases espontâneas em camundongos C57BL/6 com melanomas intraperitoneais após o tratamento com orlistat.

Também do nosso grupo, Zecchin *et al.* (2011) relataram que a inibição de FASN nas células B16-F10, com orlistat ou cerulenina, induz apoptose através da via intrínseca, causada pela ativação das caspases -9 e -3 e liberação do citocromo c, independente da ativação de p53, de calcineurina, ou da abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Seguin *et al.* (2012) descreveram redução de 53,4% nas metástases pulmonares experimentais a partir da inoculação das células de melanoma B16-F10 na cauda de camundongos C57BL/6 após tratamento com orlistat. Observaram também diminuição dos vasos sanguíneos peritumorais em melanomas experimentais cutâneos tratados com orlistat, além de redução da viabilidade, da proliferação e da capacidade de formação de estruturas do tipo capilar *in vitro* por células endoteliais. Em conjunto, estes resultados sugerem que a inibição de FASN pode ser útil no tratamento do melanoma, visando o controle da sua disseminação metastática.

Corroborando resultados estritamente laboratoriais, Innocenzi *et al.* (2003) demonstraram, por imuno-histoquímica, que FASN é altamente expressa em melanomas e observaram correlação positiva entre a sua expressão e o índice Breslow, que avalia a profundidade do tumor em milímetros. No mesmo estudo, foi observada ainda uma correlação inversa entre a expressão de FASN e o tempo de sobrevida dos pacientes, onde uma alta expressão de FASN esteve associada a maiores taxas de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e consequente pior prognóstico e menor sobrevida. Na mesma linha, Kapur *et al.* (2005) avaliaram a expressão imuno-histoquímica de FASN em 48 melanomas primários e 18 metastáticos e observaram aumento gradual da produção de FASN de acordo com a agressividade tumoral, o que foi correlacionado positivamente com os índices de Breslow e Clarck.

2.5 Melanoma e resposta imune

A inflamação desempenha um papel importante na melanogênese, pois quando induzida por radiação UV está associada a um maior fluxo de sangue, maior permeabilidade vascular e danos as estruturas celulares, decorrentes de espécies reativas de oxigênio (revisado por Margolin, 2014). A imunossupressão induzida pela radiação UV reduz o número de células de Langerhans, diminui a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e outras substâncias com efeitos supressores, tais como IL-4, IL-10 e prostaglandina E2. A radiação UV também estimula a produção de fatores de crescimento com efeitos na tumorigênese, tais como o fator estimulante alfa-melanócito e o fator de ativação de plaquetas (PAF). A neuropilina-1, membro da família de receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), contribui para os efeitos pró-tumorais em células T reguladoras no melanoma, sendo seus efeitos mediados pelo fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (revisado por Margolin, 2014).

O microambiente tumoral é formado não apenas por células neoplásicas, mas também por células do estroma, células do sistema imunológico e vários outros tipos de células não tumorais, além de outros elementos como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e nutrientes que podem promover alterações nas células tumorais (Joyce *et al.*, 2009; Holen, 2011; Quail *et al.*, 2013). Nos melanomas, grande parte das células não tumorais é representada por células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos T e B, células *natural killer* e células dendríticas, além de eosinófilos e neutrófilos em menor quantidade (Hillen *et al.*, 2008). Assim como em outros tumores, as células do sistema imune que se infiltram nos melanomas são produtoras de uma vasta gama de citocinas, em especial as de padrão Th1, como IL-12, TNF α e IFN- γ , que favorecem o desenvolvimento de uma resposta imune bem sucedida contra os tumores (Sica *et al.*, 2000; revisado por Balkwill & Mantovani, 2001; revisado por Ilkovitch & Lopes, 2008). No entanto, as células de melanoma possuem capacidade de produzir IL-10 e TGF- β , os quais convertem a resposta imune para um padrão Th2,

exercendo assim atividade imunossupressora, uma vez que podem inibir células imuno-competentes favorecendo a progressão tumoral e disseminação metastática (Enzmann *et al.*, 1998; revisado por Ilkovitch & Lopes, 2008).

2.6 Citocinas

Citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa que atuam como sinais estimulantes, modulatórios ou inibitórios para diversas células do sistema imunológico (Varella & Forte, 2001). São produzidas pelas células do próprio sistema imunológico, como os monócitos, macrófagos, células T ativadas, células B, células *natural killere* também por fibroblastos, através da ativação de proteína-quinases ativadas por mitógenos e também células tumorais. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino e autócrino (Lin *et al.*, 2000; Mehra *et al.*, 2005; Sprague *et al.*, 2009; Sommer *et al.*, 2010), exercendo suas funções em receptores específicos nas membranas das células alvo. A ligação ao receptor é feita com alta especificidade na porção extracelular, o que promove uma sinalização intracelular envolvendo as proteínas da porção citosólica (Hanada & Yoshimura, 2002).

As citocinas desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra microrganismos, pois ativam a imunidade inata através da indução de inflamação local e respostas sistêmicas de fase aguda. São importantes na iniciação, ampliação, direção, mediação e regulação da imunidade adaptativa (Holdsworth *et al.*, 2015). No entanto, quando não há resolução do processo, ocorre estabelecimento de uma inflamação crônica devido ao excesso de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que produzem reações inflamatórias não controladas (Sethi *et al.*, 2012).

As citocinas podem ser classificadas de várias formas, sendo a mais comum quanto a sua origem celular. As citocinas derivadas de linfócitos T auxiliares (T *helper*, Th) são classificadas em dois tipos, Th1 e Th2. As citocinas Th1, em sua maioria pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e TNF), estimulam a

fagocitose de células infectadas através da ativação de macrófagos, desencadeiam a produção de anticorpos e ativam o sistema complemento que contribui para a opsonização das partículas a serem fagocitadas (Raghupathy, 2001). As citocinas tipo Th2 são as IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que medeiam a defesa humoral e tem caráter anti-inflamatório, estimulando a produção de anticorpos contra antígenos extracelulares, sendo também responsáveis por inibir as funções macrofágicas (Raghupathy, 2001; Sprague *et al.*, 2009).

2.6.1 Interleucina 10 (IL-10)

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória sintetizada por linfócitos T regulatórios, como resposta a estímulos exógenos ou endógenos. Sua principal função é inibir os macrófagos ativados e, assim, manter o controle homeostático das respostas imune inatas e mediadas por células. IL-10 suprime a atividade das células imunes através da inibição da liberação de outras citocinas, da apresentação de antígenos e também da fagocitose, tendo sua atividade mediada por seu receptor IL-10R (Sabat *et al.*, 2010).

IL-10 exerce seu efeito anti-inflamatório por meio da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF α pelos macrófagos ativados (Hart *et al.*, 1995). Além disso, esta citocina estimula a proliferação de mastócitos e reduz a produção de IFN- γ pelas células *natural killer* (Zanget *et al.*, 2007). Após a geração de uma resposta imune pró-inflamatória, IL-10 age atenuando a inflamação, que pode ser deletéria para o hospedeiro se não controlada, limitando os danos teciduais. No entanto, as propriedades imunossupressoras da IL-10 também podem ser exploradas por patógenos, levando a uma redução nas respostas pró-inflamatórias e antígeno-específicas, que são necessárias para controlar ou eliminar a infecção (Cyktor & Turner, 2011).

Em melanomas, a produção de IL-10 pelas células neoplásicas aumenta à medida que os tumores primários progredem de melanoma *in situ* para

melanoma invasivo e metastático (Eijun *et al.*,2011). Acredita-se que a IL-10 pode ter diferentes papéis durante o desenvolvimento e progressão do tumor. De fato, já foi demonstrado que na presença de IL-10, há mais rápida proliferação de células de melanoma (Yue *et al.*, 1997; Gerlini *et al.*,2004). Apesar deste mecanismo imunológico de evasão, foi demonstrado que a IL-10 mostra um efeito antitumoral através da inibição da angiogênese (Lech *et al.*, 2004; Shih *et al.*, 2005).

2.6.2 Interleucina 12 (IL-12)

A identificação da interleucina 12 (IL-12) foi feita por Kobayshi *et al.* (1989) enquanto buscava a explicação para a proliferação das células *natural killer*, sendo inicialmente designada como “fator estimulante de células *natural killer*”. IL-12 é uma citocina heterodimérica, para a qual a expressão das duas cadeias é essencial para que ela seja funcionalmente ativa, é secretada por macrófagos após ativação por células apresentadoras de antígeno (APC), porém não há expressão de IL-12 quando IL-10 está sendo induzida (Mayers & Johnson, 1998).

A IL-12 é considerada uma molécula chave no sistema imune. Suas atividades principais ocorrem sobre as células T e *natural killer*, sendo uma função biológica importante a indução de IFN- γ , que por sua vez dirige a resposta imunológica para citotóxica com fenótipo Th1, diminuindo a produção das citocinas Th2. Outros mecanismos também contribuem para atividade antitumoral de IL-12, como os seus efeitos antiangiogênicos e na remodelação da matriz extracelular do tumor e do estroma peritumoral (Kerkar *et al.*, 2013). Dabrowasha *et al.* (2001) demonstraram o efeito antiangiogênico da IL-12 em células de melanoma murino B16-F10, usando esta citocina com um inibidor de metaloproteinases (BB-94). Neste estudo, onde IL-12 estimulou a produção de IFN- γ que, em combinação com BB-94, proporcionou maior efeito antitumoral. Mediante seus efeitos antitumorais, IL-12 vem sendo estudada como um adjuvante para a imunoterapia do melanoma em estudos de caráter pré-clínico (Ribas *et al.*, 2002).

2.6.3 Interferon gama (IFN- γ)

O interferon gama (IFN- γ), ou fator de ativação de macrófagos, é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida nos mecanismos de defesa, estabelecimento de processos inflamatórios e autoimunes, controle de programas fagocitários, bactericidas e tumoricidas em macrófagos, produção de mediadores derivados de macrófagos, como TNF- α , IL-1 e IL-12, além de atuar na regulação negativa da síntese de mediadores anti-inflamatórios, tais como IL-10 (El-Hashemite *et al.*, 2004; Baronet *et al.*, 2008). É produzido e liberado pelos linfócitos T e células *natural killer* durante a oitava semana de desenvolvimento em humanos e em resposta a antígenos e citocinas como IL-12 e IL-18 (Fadel & Sarzzotti, 2000; Airoidi *et al.*, 2000). Sua ação ocorre através da interação com as subunidades α e β do seu receptor, levando a ativação das Janus quinases (JAK), uma família de tirosina-quinases intracelulares que fazem a sinalização celular mediada por citocinas pela via sinalizadora JAK-STAT (Platanias *et al.*, 2005).

O IFN- γ é crucial para a imunidade inata contra microorganismos patógenos intracelulares e também para o controle de neoplasias malignas (Dunnet *et al.*, 2006). Linfócitos T citotóxicos e células *natural killers* ativadas secretam várias moléculas com o intuito de lisar as células tumorais, dentre elas o IFN- γ , que reforça a apresentação de antígenos e promove a proliferação, sobrevivência e expansão das células T CD8⁺ (Dighe *et al.*, 1994; Smyth *et al.*, 2005). Esta citocina é considerada um agente útil na terapia de neoplasias malignas, pois inibe diretamente a proliferação das células tumorais e aumenta a resposta imunológica contra o tumor, inibindo desta forma progressão (Miller *et al.*, 2009). Em melanomas, IFN- γ é considerado indispensável para induzir a rejeição do tumor pelo sistema imune (Palmer *et al.*, 2008).

2.6.4 Fator de crescimento transformante beta (TGF- β)

O TGF- β é um potente fator limitante do crescimento celular com propriedades anti-inflamatórias e de regulação da resposta imune, pois controla a proliferação de células epiteliais, hematopoiéticas e endoteliais, além de favorecer a formação da matriz extracelular pelas células mesenquimais (Roberts *et al.*, 1998; Hauck *et al.*, 2005). Esta citocina promove inibição da proliferação de células do tecido conjuntivo e diminuição da degradação do colágeno, sua desregulação está relacionada a diversas doenças, dentre elas o câncer, fibroses, doenças auto-imunes e alterações vasculares (Zeisberg *et al.*, 2003; ten Dijke & Arthur, 2007).

O TGF- β tem sido associado de forma consistente com um fenótipo tumoral agressivo, pois possui a capacidade de converter a resposta imune de um padrão Th1 para Th2, favorável à manutenção de tumores, como ocorre nos melanomas (Valenti *et al.*, 2006). Nos estágios iniciais da tumorigênese, atua como um potente inibidor do ciclo celular e é considerado um fator pró-apoptótico e inibidor da proliferação celular (Bierie *et al.*, 2006). No entanto, estes efeitos supressores são aparentemente perdidos com o passar do tempo e em tumores avançados as células passam a secretar TGF- β , o que facilita a invasão, angiogênese e disseminação metastática (Bierie *et al.*, 2006). Tumores de pele com alta expressão de TGF- β demonstram evasão do sistema imune através da inibição da ativação de células T citotóxicas (Torre-Amione, 1990). Por fim, melanomas que secretam TGF- β de forma considerável inibem a migração das células dendríticas (Halliday, 2001).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos e influência do tratamento com orlistat na viabilidade celular e na resposta imunológica *in vitro*, em células B16-F10.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Determinar o IC₅₀ da droga orlistat nas células B16-F10

3.2.2 Verificar a secreção de IL-10, TGF- β , IL-12 e IFN- γ nos sobrenadantes das células B16-F10 tratadas com orlistat.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

A linhagem celular B16-F10 (ATCC, Manassas, VA, E.U.A), derivada de melanoma murino, foi cultivada em frascos plásticos de 75 cm² (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Campinas, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen), na diluição de 1:100, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e a 37°C.

As células foram subcultivadas ao atingir uma confluência de 70 a 80% (aproximadamente 48 h). Para isto, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 5 mL de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e então incubadas a 37°C com 2 mL de tripsina a 2%, por um período de 1 a 3 minutos. Quando as células perdiam a adesão do assoalho do frasco de cultura (determinado por observação em microscópio de contraste de fase) a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 10 mL de meio de cultura contendo 10% de FBS. A suspensão de células foi então transferida para tubos cônicos de plástico de 15 mL estéreis (Corning Costar, New York, NY, E.U.A.) e centrifugadas a 800xg por 3 min. Removido o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 5 mL de meio de cultura com 10% de FBS, contadas e transferidas para novos frascos de cultura. Para utilizar células em passagens semelhantes nos experimentos desta pesquisa, um estoque foi armazenado em nitrogênio líquido. As células foram ressuspensas em solução 1/1 contendo 20% de di-metil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, E.U.A.) e RPMI com 50% de FBS e congeladas em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os criotubos (Corning, E.U.A.) foram agitados rapidamente em banho de água a 37°C e, as células transferidas para tubos de 15 mL contendo 8 mL de meio suplementado e então centrifugadas como descrito anteriormente. As células foram então ressuspensas em 10 mL de meio de cultura e plaqueadas nos frascos plásticos. Em todos os procedimentos

de cultivo celular foram observados todos os princípios para a manutenção da esterilidade e para evitar contaminação entre diferentes culturas.

4.2 Preparo das soluções de Orlistat

O composto ativo do orlistat (Xenical[®], Roche, Suíça) foi extraído de acordo com Knowles *et al.* (2004), dissolvendo-se o conteúdo de uma cápsula em 1 mL de etanol absoluto, seguido de agitação a cada 10 min por 30 min em temperatura ambiente. A seguir, a solução foi centrifugada a 16.000 xg por 5 min e o sobrenadante coletado e mantido a -80°C até o momento do uso.

4.3 Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada utilizando 3 - (4,5-dimetil-2-yl) -2,5 difeniltertrazolim brometo (MTT, Promega, Michigan, E.U.A.). Para isto, foram plaqueadas 1×10^5 células B16-F10 em 500 µl de meio rpmi, suplementado com 10% de fbs, em placas de 24 poços. Após 24 horas, iniciou-se o tratamento com orlistat a 50, 100, 200, 400 e 800 µm (e etanol na maior concentração como controle). Seguindo as orientações do fabricante, após 24 horas de tratamento, foram utilizados 75 µl da solução corante por um período de 4 horas incubados em 5% de CO₂ e 95% de umidade a 37°C. Para dissolver os cristais de formazan, adicionou-se 500 µl da solução de solubilização por 1 hora, seguida de homogeneização da solução, como preparo para leitura. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços e as absorbâncias mensuradas em um leitor de elisa (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) ajustado para 570 nm.

4.4 Cálculo do IC₅₀

O valor do ic₅₀ (metade da concentração máxima inibitória) indica a concentração de um fármaco necessária para inibir a função biológica ou

bioquímica pela metade *in vitro*. Para o cálculo do IC₅₀ utilizou-se o *software* Compusyn (E.U.A.) desenvolvido por Chou & Martin (2005).

4.5 Quantificação de citocinas por ELISA

As citocinas IL-10, TGF- β , IFN- γ e IL-12 foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células B16-F10 tratadas com orlistat (Xenical[®], Roche, Suíça), utilizando kits de ELISA da BD Opteia (BD Biosciences, USA) para as respectivas citocinas de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, 50 μ L da solução de anticorpos de captura diluída em tampão apropriado foram adicionados à placa e foi incubados por 18 horas a 4°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e as ligações inespecíficas bloqueadas pela adição de 100 μ L da solução de bloqueio, durante incubação por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados 5 vezes com tampão de lavagem. Um volume de 100 μ L das soluções da curva com concentrações padrão e o mesmo volume de amostras a serem tratadas foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas, 100 μ L da solução reveladora, contendo os anticorpos de detecção conjugados à biotina, foram adicionados em cada poço da placa e incubada por 1 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas rapidamente e 100 μ L do substrato foram adicionados. Após cerca de 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, a reação colorimétrica foi bloqueada pela adição de 50 μ L de solução 1 M H₃PO₄. A absorbância foi mensurada utilizando-se comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (Bio Rad, Hércules, CA, EUA).

4.6 Forma de análise dos resultados

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

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da IC₅₀ do orlistat nas células B16-F10.

Os efeitos citotóxicos e/ou de inibição da proliferação das células B16-F10 após tratamento com orlistat por 24, 48 e 72 horas (**Figuras 1, 2 e 3**) foram avaliados por meio do método de MTT. O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é utilizado para determinar a viabilidade celular, o qual quantifica quanto do MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP formando cristais de formazan, de cor azul. Assim, a quantidade de formazan é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mossman, 1983). Dependendo do tipo de experimento, o MTT pode ser utilizado para medir, de maneira indireta, proliferação celular.

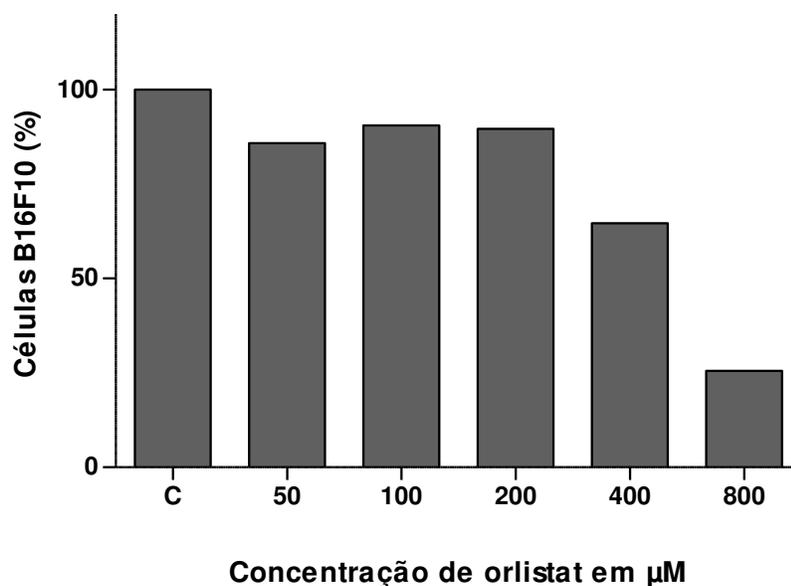


Figura 1. Efeitos do orlistat em sobre a inibição da proliferação e/ou morte celular na linhagem B16-F10 após 24 horas de tratamento em meio de cultura com 10% de FBS. As células foram expostas a concentrações exponenciais da droga (50, 100, 200, 400 e 800 μM) e como controle foi usada a concentração de etanol correspondente a maior dosagem de orlistat. A avaliação pela técnica do MTT não demonstrou relação dose-dependente.

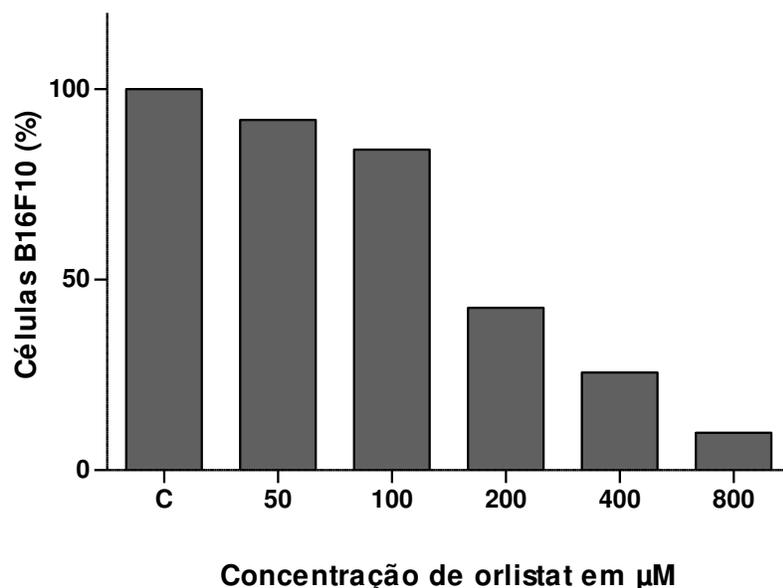


Figura 2. Efeitos do orlistat sobre a inibição do crescimento e/ou morte celular na linhagem B16-F10 após 48 horas de tratamento. As células foram expostas a concentrações exponenciais da droga (50, 100, 200, 400 e 800 μM) e como controle foi usada a concentração de etanol correspondente a maior dosagem de orlistat Após avaliação pelo método MTT observa-se uma relação dose-dependente.

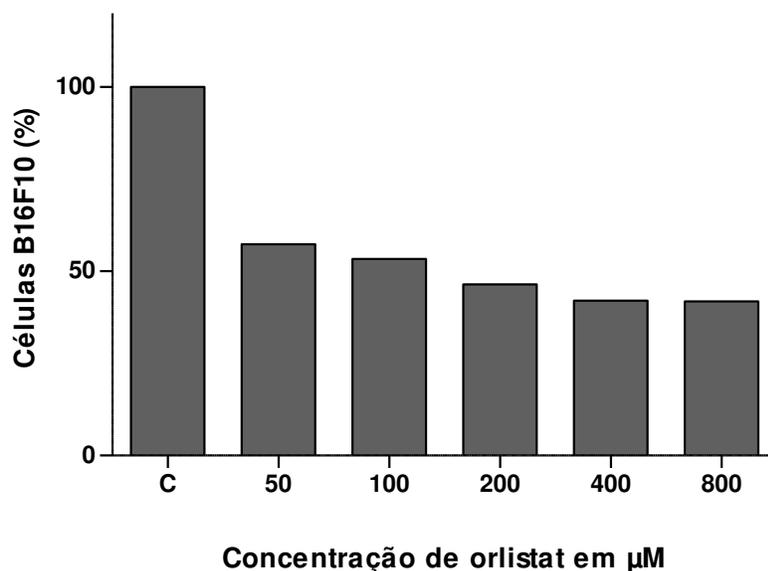


Figura 3. Efeitos do orlistat sobre a inibição da proliferação e/ou morte celular na linhagem B16-F10 após 72 horas de tratamento. As células foram expostas a concentrações exponenciais da droga (50, 100, 200, 400 e 800 μM) e como controle foi utilizada a concentração de etanol correspondente a maior dosagem de orlistat. A avaliação pela técnica do MTT mostrou nítida redução da proliferação e/ou viabilidade celular já na concentração de 50 μM .

Os valores de densidade óptica obtidos a partir das análises colorimétricas dos efeitos das concentrações de orlistat sobre as células B16-F10 nos diferentes tempos de tratamento foram analisados com o auxílio do *software* CompuSyn, especificamente desenhado para o estudo da relação dose-efeito e de interações entre diferentes drogas (Chou, 2010). As concentrações de orlistat utilizadas para a determinação do IC₅₀ foram baseadas em estudos prévios realizados em nosso laboratório (Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin *et al.*, 2011; Seguin *et al.*, 2012; Agostini *et al.*, 2014). Assim, as dosagens que causaram 50% de inibição da proliferação e/ou morte celular (IC₅₀) foram 213 µM após 48 horas de tratamento (**Figura 4**) e 226µM após 72 horas de tratamento (**Figura 5**). Por não ter apresentado dose-dependência após o período de 24 horas de tratamento, não realizamos o cálculo do IC₅₀ para este tempo experimental.

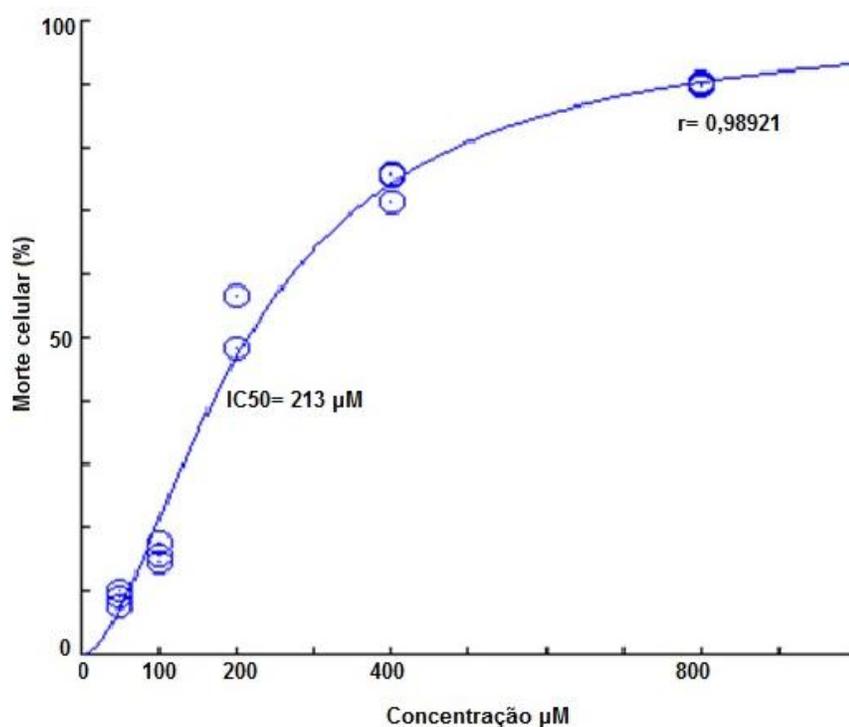


Figura 4. Efeito do orlistat sobre a inibição da proliferação e/ou morte das células B16-F10 após 48 horas de tratamento. As células foram expostas a concentrações crescentes da droga (50, 100, 200, 400 e 800 µM) e a análise de dose/efeito realizada com o auxílio do *software* CompuSyn mostrou que o IC₅₀ é 213 µM.

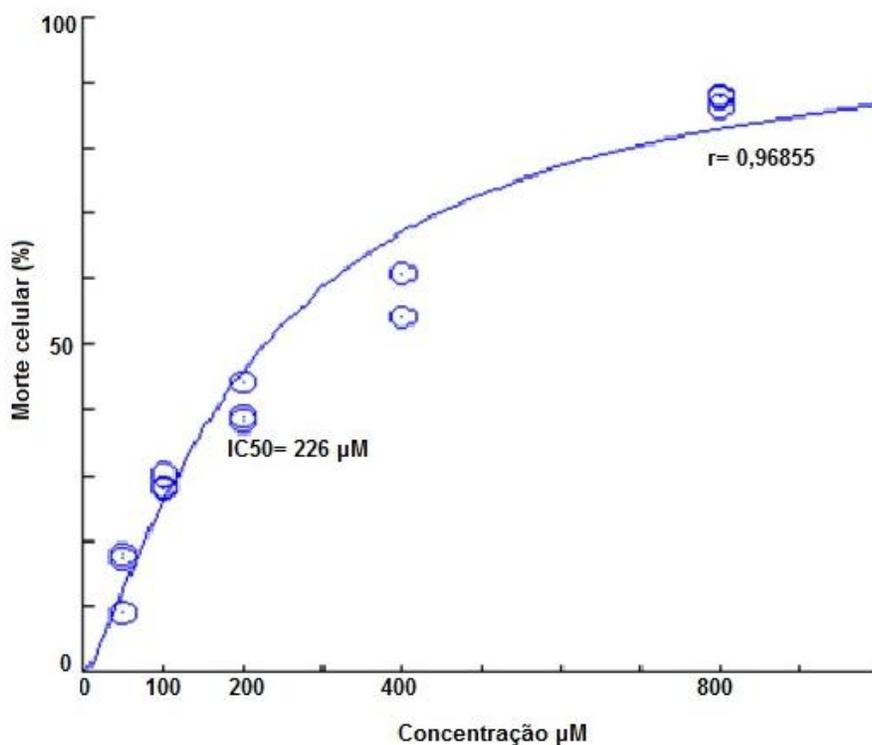


Figura 5. Efeito do orlistat sobre a inibição da proliferação e/ou morte das células B16-F10 após 72 horas de tratamento. As células foram expostas a concentrações crescentes da droga (50, 100, 200, 400 e 800 µM). A análise de dose/efeito realizada com o auxílio do *software* CompuSyn mostrou que o IC₅₀ é 226 µM.

Mediante os resultados descritos acima, a dosagem de orlistat utilizada para os tratamentos das células B16-F10 nos experimentos seguintes foi de 213 µM, visto que este foi o único experimento que apresentou evidente dose dependência.

5.2 Avaliação dos efeitos do orlistat sobre a secreção das citocinas IL-10, IL-12, TGF-β e IFN-γ pelas células B16-F10.

Com o intuito de verificar a secreção das citocinas IL-10 e TGF-β, as quais exercem atividade imunossupressora inibindo células imuno-competentes e favorecendo assim a progressão tumoral e disseminação metastática, e das

citocinas IL-12 e IFN- γ , que favorecem o desenvolvimento de uma resposta imune bem sucedida contra os tumores,(Ilkovitch & Lopes, 2008), as células de melanoma murino B16-F10 foram tratadas com o inibidor de FASN orlistat em seu respectivo IC₅₀ por 24 e 48 horas e a produção/secreção destas citocinas quantificada por meio de ensaios de ELISA.

Após 24 e 48 horas de tratamento observou-se um aumento na secreção de IL-10, no entanto, observou-se diferença estatisticamente significativa somente no período mais curto de tempo (**Figura 6**).

Com relação a TGF- β , não foi possível detectar a secreção desta citocina pelas células estudadas. É importante salientar que as curvas padrão para TGF- β funcionaram bem nos ensaios realizados, sugerindo que a sua produção é muito baixa nas células B16-F10.

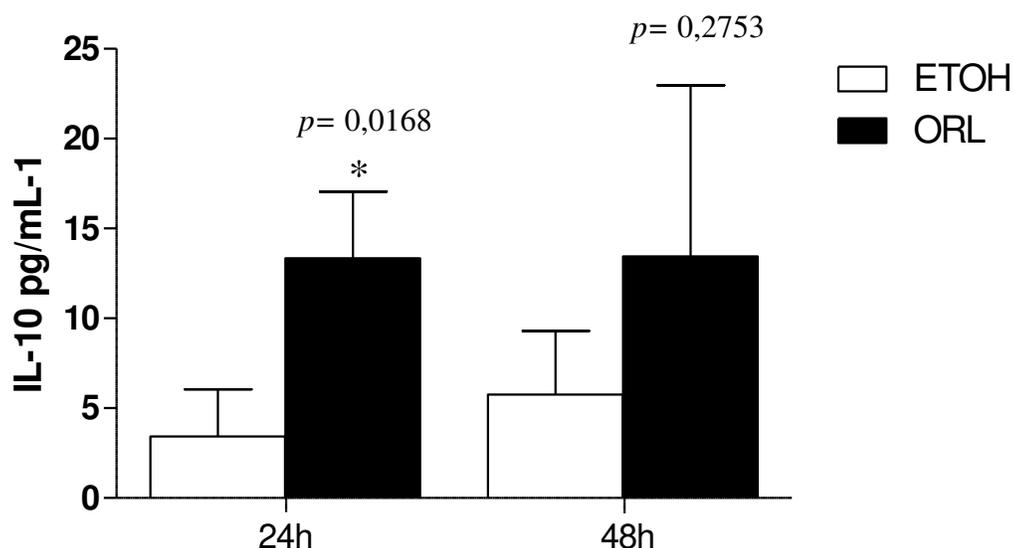


Figura 6. Secreção da citocina IL-10 pelas células B16-F10 após 24 e 48 horas de tratamento com orlistat. Observa-se diferença estatisticamente significativa no tempo de 24 horas, quando comparadas ao seu controle ($p=0,0168$). Já no tempo de 48 horas não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,2753$). Gráfico representando a média de 3 experimentos em triplicata.

Ao avaliar a citocina IL-12, observou-se significativo aumento da sua secreção após o período de 24 horas de tratamento quando comparado ao controle (**Figura 7**). No tempo de 48 horas não houve aumento da secreção de IL-12 com relação ao período de 24 horas, mas sim um aumento nas células controle (**Figura 7**).

Similarmente as experimentos realizados para a detecção de TGF- β , não observou-se IFN- γ no meio de cultura das células B16-F10 tratadas ou não com orlistat, tanto nos períodos de 24 como de 48 horas (dados não mostrados).

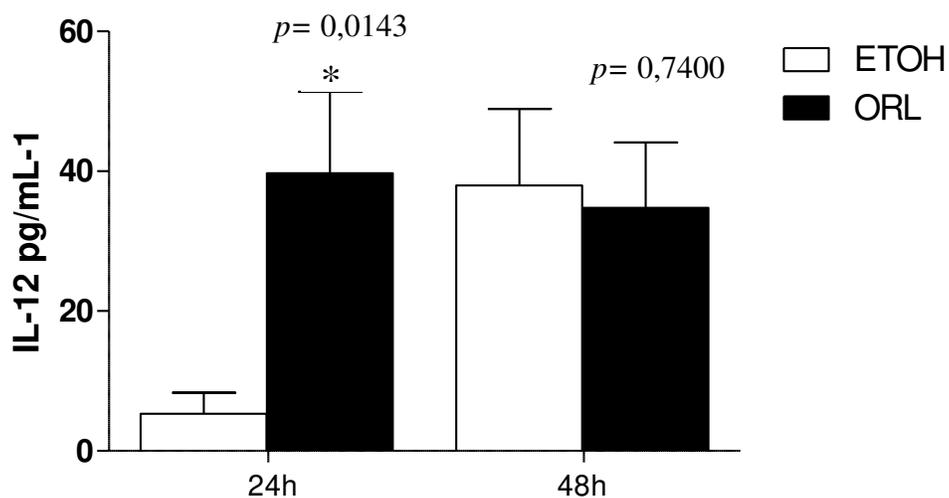


Figura 7. Secreção da citocina IL-12 pelas células B16-F10 após 24 e 48 horas de tratamento com orlistat. Observa-se aumento estatisticamente significativo na secreção de IL-12 no tempo de 24 horas, quando comparadas ao seu controle ($p=0,0143$). No período de 48 horas não foi possível observar diferenças pois houve aumento na secreção de IL-12 nas células controle. Gráfico representando a média de 3 experimentos em triplicata.

6 DISCUSSÃO

FASN é uma enzima com papel central na produção endógena de ácidos graxos, apontada como uma nova oncoproteína em tumores sólidos. Estudos têm correlacionado sua elevada expressão e atividade com a progressão tumoral e pior prognóstico de pacientes com câncer, mostrando assim, sua importância como potencial alvo no tratamento oncológico. A expressão anormalmente alta de FASN está bem documentada em diversas neoplasias malignas, dentre elas o melanoma, neoplasia estudada na presente pesquisa e que apresenta comportamento clínico agressivo, alta propensão para emissão de metástases e resistência ao tratamento radio e quimioterápico (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005; Flavin *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; Aris & Barrio, 2015). Em consequência disto, diversos laboratórios têm trabalhado no desenvolvimento de novas drogas que possam atuar como inibidores desta enzima e que ao mesmo tempo sejam pouco tóxicas e apresentem alguma possibilidade de eventuais testes clínicos.

Orlistat é um inibidor de lipases pancreáticas e gástricas, originalmente desenvolvido como droga antiobesidade com amplo uso clínico em diversos países (Guercioli *et al.*, 2004). Seu potencial como eficiente inibidor da atividade de FASN foi descrito por Kridel *et al.* (2004) através de análises proteômicas em câncer de próstata. Trabalhos previamente realizados em nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento com orlistat reduz o número de metástases espontâneas em melanomas experimentais, ocasionadas pela inoculação de células B16-F10 em camundongos C57BL/6 (Carvalho *et al.*, 2008). Neste modelo experimental, a injeção de células de melanoma na cavidade peritoneal destes animais promove metástases para a região do mediastino em 100% dos casos. Em nossos estudos, orlistat também reduziu a quantidade de vasos sanguíneos peritumorais em melanomas experimentais cutâneos, assim como diminuiu a viabilidade, proliferação, e capacidade de formação de capilares, além de promover a apoptose de células endoteliais *in vitro* (Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin

et al., 2011; Seguin *et al.*, 2012). Resultados similares foram recentemente obtidos em modelo ortotópico de carcinoma espinocelular de língua (Agostini *et al.*, 2014), onde o tratamento com orlistat foi capaz de diminuir tanto o volume como os índices de proliferação dos tumores primários provocados na língua e de reduzir o número de linfonodos cervicais metastáticos em 43%. Neste mesmo trabalho, o tratamento com orlistat provocou aumento no índice de morte por apoptose e estimulou a secreção da isoforma antiangiogênica de VEGFA, o VEGFA_{165b} pelas células SCC-9 ZsGreen LN-1, uma linhagem metastática derivada das células SCC-9 da ATCC.

Ainda não são conhecidos os efeitos do tratamento com orlistat sobre os mecanismos imunológicos desencadeados contra as neoplasias malignas. Assim, os experimentos realizados nesta pesquisa foram planejados para avaliar o efeito do inibidor de FASN, orlistat, sobre a produção de citocinas, proteínas responsáveis por enviar sinais estimulantes, modulatórios ou inibitórios para diversas células do sistema imunológico, podendo favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune bem sucedida contra tumores ou uma atividade imunossupressora (Varella & Forte, 2001).

Há evidências na literatura indicando que o sistema imunológico pode reconhecer e destruir células tumorais, decorrentes da geração natural de respostas imunes contra os antígenos associados a tumores em pacientes com câncer (Germeau *et al.*, 2005). No entanto, observa-se um aspecto paradoxal nesta resposta, pois ela pode apresentar a capacidade de proteger o hospedeiro contra o surgimento de neoplasias malignas ou mesmo de favorecer o crescimento destas (revisado por Visser *et al.*, 2006). O microambiente tumoral é complexo e contém, além das células neoplásicas, células do estroma, do sistema imunológico, de vasos sanguíneos e linfáticos, além de outros tipos de células não tumorais (Quail *et al.*, 2013). Nos melanomas, as células do sistema imune que se infiltram no tumor são produtoras de uma vasta gama de citocinas, podendo estas favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune bem sucedida contra os tumores ou exercer atividade imunossupressora, inibindo células

imunocompetentes o que pode favorecer a progressão tumoral e disseminação metastática (revisado por Ilkovitch & Lopes, 2008).

A produção das citocinas IL-10 e IL-12 pode influenciar o padrão de maturação de células dendríticas (CDs), importantes na iniciação e regulação das respostas imunes, induzindo perfis de resposta Th1 ou Th2, respectivamente (revisado por Trinchieri, 2003). O aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras na superfície das CDs é dependente da produção de IL-12. Por outro lado, IL-10 e TGF- β reduzem a produção de IL-12, impedindo a plena maturação de CDs (Corinti *et al.*, 2001). No presente estudo, demonstramos que o tratamento de células B16-F10 por 24 horas com orlistat induziu aumento da secreção de IL-10 e IL-12 para o meio de cultura. No entanto, a secreção de IL-12 (39,72 pg/mL) foi 3 vezes superior à secreção de IL-10 (13,33 pg/mL). Em 48 horas, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratado ou não com orlistat, esta droga foi capaz de manter a secreção de ambas as citocinas em níveis semelhantes ao período anterior de tratamento. Além do mais, não se pode descartar que em períodos mais prolongados possa ocorrer degradação destas proteínas no meio de cultura, impedindo seu acúmulo. No microambiente tumoral, a produção local de IL-12 pode estimular uma resposta imune mediada pela ativação de CDs, células *natural killer* (NK) e linfócitos TCD8 citotóxicos (LTCD8⁺), bem como suscitar um padrão de resposta imune Th1 (revisado por Tugues *et al.*, 2015). Portanto, a maior produção desta citocina pelas células de melanoma murino na presença de orlistat pode ter influência sobre a modulação da resposta imune antitumoral *in vivo*.

Estudos recentemente realizados em nosso laboratório (Almeida, LY e Mariano, FS, dados ainda não publicados) demonstraram que orlistat promove a maturação de CDs intratumorais mediada pelo aumento da expressão de CD80 e CD81 em suas superfícies e produção de IL-12, quando comparada a IL-10, promovendo um perfil de resposta imune Th1 em modelo de melanoma murino (B16-F10/C57BL/6). Além disto, estes trabalhos também mostraram que o orlistat aumenta a ativação de células NK e LTCD8⁺, bem como reduz a população de

linfócitos T reguladores (LTregs) no tumor primário. Em conjunto com os dados mostrados nesta dissertação de mestrado, estes resultados sugerem que orlistat é capaz de induzir uma resposta imune antitumoral através da modulação do componente tumoral e inflamatório.

Apesar de IL-12 e IL-10 apresentarem ações antagônicas, Lopez *et al.* (2005) demonstraram que a imunoterapia com administração local de células neoplásicas autólogas que expressavam conjuntamente estas duas citocinas induz uma remissão tumoral sinérgica de 50-70% em camundongos BALB/c nude portadores de tumores subcutâneos de carcinoma de cólon (CT26) e de mama (LM3) pré-estabelecidos. Neste mesmo estudo, o tratamento de células LM-3 com IL-10 + IL-12, foi superior à imunoterapia individual na redução de metástases pulmonares espontâneas e aumento da sobrevida destes animais. Em nosso laboratório, demonstramos que orlistat reduz em 50% o número de metástases espontâneas para linfonodos mediastínicos e inibe a colonização pulmonar em modelos de melanoma murino (B16-F10/C57BL/6) (Carvalho *et al.* 2008; Seguin *et al.*, 2012). Diversos estudos associam o uso terapêutico de IL-12 com atividade antimetastática em tumores murinos (Brunda *et al.*, 1993; Fujiwara & Hamaoka, 1996; Weber *et al.*, 2004). Na presente pesquisa, apesar de demonstrarmos que a produção de IL-12 por células B16-F10 tratadas com orlistat é prevalente, esta também foi acompanhada pela produção de IL-10. Assim, hipotetizamos que a expressão combinada de IL-10 e IL-12 nestas células possa ser eficiente em mediar uma resposta imune antitumoral e antimetastática sinérgica.

IL-12 exerce atividade antitumoral de maneira dependente ou independente de IFN- γ (Nanni *et al.*, 2001; Colombo e Trinchieri, 2002; Airoid *et al.*, 2004), através da modulação do sistema imune e de mecanismos antiangiogênicos (Voest *et al.*, 1995; Sgadari *et al.*, 1996). A inibição da angiogênese por meio da IL-12 pode ser mediada indiretamente através da secreção de IFN- γ por células NK e LTCD8⁺, que por sua vez leva à liberação das citocinas antiangiogênicas CXCL9, CXCL10 e CXCL11, ou ainda pela redução da produção de VEGF e FGF-2 (fator de crescimento de fibroblasto-2) (Kanegane *et*

al., 1998; Dias *et al.*, 1998; Duda *et al.*, 2000). Por outro lado, outros estudos propõem mecanismos independentes de IFN- γ , os quais requerem interações diretas entre linfócitos e células endoteliais (Strasly *et al.*, 2001) ou modulação da expressão gênica de células malignas, que passam a adquirir um fenótipo menos angiogênico (Cavallo *et al.*, 2001). Airolti *et al.* (2006) demonstraram que melanomas murinos subcutâneos constituídos por células B16 positivas para o receptor de IL-12 (IL12R+) apresentaram uma menor densidade de vasos sanguíneos, bem como redução da proliferação e aumento da morte celular em camundongos C57BL/6J *knockout* para o gene IL12RB2 (deficientes na produção de IFN- γ , bem como de células T e NK citotóxicas), quando comparados aos animais do tipo selvagem. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que IL-12 inibe o crescimento tumoral e a angiogênese, principalmente por reduzir a expressão de fatores pró-angiogênicos, tais como angiopoietina- 1 e 2, eotaxina, MMP-9, dentre outras, e não por aumentar a expressão de fatores antiangiogênicos, uma vez que IFN- γ , CXCL9, CXCL10 e CXCL11 não foram detectados por imuno-histoquímica.

Em nosso laboratório, também demonstramos que orlistat aumenta a produção da isoforma antiangiogênica de VEGFA, o VEGF_{165b}, em células de melanoma (SK-MEL) e de carcinoma espinocelular oral (SCC-9) humanos, além de reduzir a formação de capilares sanguíneos peritumorais em melanomas experimentais cutâneos (Seguin *et al.*, 2012). Em outro estudo, a análise dos extratos proteicos totais provenientes de tumores primários de melanomas murinos intraperitoneais mostrou que orlistat aumentou os níveis de TGF- β mas não foi capaz de interferir na produção de IL-10, IL-12 ou IFN- γ (Almeida LY e Mariano FS, dados ainda não publicados). No entanto, estes mesmos autores demonstraram que a comparação entre os grupos tratados revela que a produção de IL-12 é 1,4 e 5,7 vezes superior à de TGF- β e IFN- γ , respectivamente. Por outro lado, nos respectivos linfonodos metastáticos, apesar de esta droga induzir aumento significativo de TGF- β , redução de IL-10 e IL-12, bem como não alterar os níveis de IFN- γ , a produção de IL-12 é aproximadamente 4 vezes superior a

TGF- β e IL-10 e 11 vezes maior que a de IFN- γ , favorecendo uma resposta imune moderada de perfil Th1, provavelmente independente da produção de IFN- γ . A presente dissertação mostra que as células B16-F10 produzem IL-10 e IL-12, cujas secreções são aumentadas na presença de orlistat, mas não expressam TGF- β ou IFN- γ , sugerindo que o tratamento promove um equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias.

Em conjunto, os resultados desta pesquisa sugerem que a inibição do crescimento tumoral e os efeitos antimetastáticos obtidos pela inibição de FASN com orlistat em estudos prévios (Carvalho *et al.*, 2008; Seguin *et al.*, 2012, Agostini *et al.*, 2014) possam estar associados ao fenótipo antiangiogênico induzido por esta droga, mediado pela modulação da expressão gênica das células neoplásicas e imunes, através do aumento da produção VEGF_{165b} e de IL-12, de maneira independente de IFN- γ .

7 CONCLUSÃO

O tratamento com orlistat induz a secreção de IL-10 e IL-12 em células de melanoma murino B16-F10, sugerindo que esta droga apresenta um potencial efeito imunomodulador.

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders. Immunity to tumors 2000; p.384-403.
- Abbas, A.K., Imunologia Celular e Molecular. 5. ed., ed. A.H.L. Abul K. Abbas. 2005, Rio de Janeiro: Elsevier.
- Agostini M, Almeida LY, Bastos DC, Ortega RM, Moreira FS, Seguin F, Zecchin KG, Raposo HF, Oliveira HC, Amoêdo ND, Salo T, Coletta RD, Graner E. Mol Cancer Ther. 2014 Mar;13(3):585-95.
- Airoidi I, Gri G, Marshall JG, Corcione A, Facchetti P, Guglielmino R, et al. Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. J. Immunol. 2000; 165: 6880 – 6888.
- Airoidi I, Di Carlo E, Banelli B, Moserle L, Cocco C, Pezzolo A, Sorrentino C, Rossi E, Romani M, Amadori A, Pistoia V. The IL-12Rbeta2 gene functions as a tumor suppressor in human B cell malignancies. J Clin Invest. 2004 Jun;113(11):1651-9.
- Airoidi I, Di Carlo E, Cocco C, Taverniti G, D'Antuono T, Ognio E, Watanabe M, Ribatti D, Pistoia V. Endogenous IL-12 triggers an antiangiogenic program in melanoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 6;104(10):3996-4001. Epub 2007 Feb 23.
- Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer-a double-edged sword. Trends Cell Biol, 2001; 11, 44-51.

- Al-Batran SE, Rafiyan MR, Atmaca A, Neumann A, Karbach J, Bender A, et al. Intratumoral T-cell infiltrates and MHC class I expression in patients with stage IV melanoma. *Cancer Res* 2005; 65:3937-41. Disponible em: PMID:15867394; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4621>.

- Alexander P. Macrophages and tumours. *Schweiz. Med. Wochenschr* 106 (40), 1976; 1345–1350.

- Alli PM, Pinn ML, Jaffee EM, McFadden JM, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene* 2005; 24, 39–46.

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

- Angiolillo AL, Sgadari C, Tosato G. A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 795:158–167 33.

- Aris M, Barrio MM. Combining immunotherapy with oncogene-targeted therapy: a new road for melanoma treatment. *Front Immunol.* 2015 Feb 9; 6:46.

- Arlina P. Wiguna and Peter Walden. Role of IL-10 and TGF- β in melanoma. *Experimental Dermatology*, 2015, 24, 209–214.

- Asselin-Paturel C, Lassau N, Guinebretiere JM, Zhang J, Gay F, Bex F, et al. Transfer of the murine interleukin-12 gene in vivo by a Semliki Forest virus vector induces B16 tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by Doppler ultrasonography, *Gene Ther.* 1999; 606–615.

- Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Oncol* 2001; 3(2): 105-112.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet*. 2001 Feb 17; 357(9255): 539-45. Review.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2005.
- Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem* 2004; 91 (1): 47-53.
- Baron R, Nemirovsky A, Harpaz I, Cohen H, Owens T, Monsonego A. IFN γ enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2008; 22(8): 2843-52.
- Belágyi T, Zsoldos P, Makay R, Issekutz A, Oláh A. Multiorgan resection (including pancreas) for metastasis of cutaneous malignant melanoma. *Journal of the Pancreas* 2006; 7 (2): 234-240.
- Benjamini E, Coico R, Sunchine G. *Imunologia*. 4 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2002. p.115.
- Bernabei P, Coccia EM, Rigamonti L, Bosticardo M, Forni G, Pestka S, et al. Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 950–960.
- Bershtein LM, Pozharisskiĭ KM, Maksimova NA, Kovalevskiĭ Alu, Imianitov EN. An immunohistochemical study of aromatase, estrogen 4-hydroxylase and fatty acid synthetase in breast cancer tissues from BRCA1 mutation carriers. *Vopr Onkol*. 2009; 55 (1): 29-32.

- Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6, 506-20.

- Biggs MW, Eiselein JE. Suppression of immune surveillance in melanoma. *Med Hypotheses*. 2001; 56:648–52.

- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; 196: 254.

- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 749–795.

- Boyano MD, Garcia-Vazquez MD, Lopez-Michelena T. Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. *Br J Cancer*. 2000; 83:847–52.

- Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol*. 2010;28:3167–3175.

- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:2455–65.

- Brown TJ, Lioubin MN, Marquardt H. Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon gamma, and oncostatin M for human melanoma cells. *J Immunol* 1987; 139: 2977–2983.

- Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med.* 1993 Oct 1;178(4):1223-30.

- Buck MB, Fritz P, Dippon J. Prognostic significance of transforming growth factor beta receptor II in estrogen receptornegative breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004; 10, 491-8.

- Cardoso RJA, Goncalves EAN. 20a Arte Ciencia Tecnica, Artes Medicas: Sao Paulo; 2002.

- Carranza FA & Newman MG. *Periodontia Clinica*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 1997.

- Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, et al. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer.* 2008 Dec 1; 123 (11): 2557-65.

- Cavallo F, Quaglino E, Cifaldi L, Di Carlo E, André A, Bernabei P, Musiani P, Forni G, Calogero RA. Interleukin 12-activated lymphocytes influence tumor genetic programs. *Cancer Res.* 2001 Apr 15;61(8):3518-23.

- Chen P, Huang Y, Bong R, et al. Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3330.

- Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer.* 1994; 56:755–60.

- Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 2003; 3 (8): 559-570.

- Cho H, Lee Y, Celis E. Interferon γ limits the effectiveness of melanoma peptide vaccines. *Blood*. 2011, 117(1): 135–144.

- Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* 2005; 115: 813-824.

- Clark WH Jr., Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1893-904; PMID:2593166; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/81.24.1893>.

- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450:566–9.

- Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Apr;13(2):155-68.

- Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol*. 2001 Apr 1;166(7):4312-8.

- Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008; 180: 5771-7.

- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420:860-7.

- Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*, 1997; 10: 742-780.

- Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*, 1997; 10:742-780.

- Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol*. 2005; 174:4465–4469.

- Cyktor JC, Turner J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infection and Immunity* 2011; 79(8): 2964-2973.
- Dabrowska A, Giermasz A, Gołab J, Jakóbisiak M. Potentiated antitumor effects of interleukin 12 and interferon alpha against B16F10 melanoma in mice. *Neoplasma*. 2001;48(5):358-61.

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

- Del VM, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application, *Clin. Cancer Res*. 2007; 4677–4685.

- DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer principles & practice of oncology*. In: *Melanoma*. 2005; 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

- Dias S, Boyd R, Balkwill F. IL-12 regulates VEGF and MMPs in a murine breast cancer model. *Int J Cancer*. 1998 Oct 29;78(3):361-5.

- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD: Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994; 1:447–456.

- Dijke PT, Arthur HM. Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. 2007; 8:857-869.

- Dong H, Strome SE, Salomao DR. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002; 8:793–800.

- Dowling S, Cox J, Cenedella RJ. Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. *Lipids*, 2009 Jun; 44 (6): 489 - 98.

- Draing, C., Sigel, S., Deininger, S., Traub, S., Munke, R., Mayer, C., Hareng, L. et al., Cytokine induction by Gram-positive bacteria. *Immunobiology.* 2008. 213: 285–296.

- Duda DG, Sunamura M, Lozonchi L, Kodama T, Egawa S, Matsumoto G, Shimamura H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res.* 2000 Feb 15;60(4):1111-6.

- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 2002; 298:850–4.

- Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Brocker EB. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res.* 1995; 5:67–8.

- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:836–848.

- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:329–60.

- Eijun I, Rong-Rong H, Duan-Ren W, Eberhard P, Wünsch PH, Cochran AJ. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod Pathol* 2011; 24: 801–9.

- El-Hashemite N, Zhang H, Walker V, Hoffmeister KM, Kwiatkowski DJ. Perturbed IFN-gamma-Jak-signal transducers and activators of transcription signaling in tuberous sclerosis mouse models: synergistic effects of rapamycin-IFN-gamma treatment. *Cancer Res.* 2004 May 15;64(10):3436-43.

- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(3):514-25.

- Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. UK: Oxford; 2008. p. 31-7.

- Enzmann H, Bomhard E, Iatropoulos M, Ahr HJ, Schlueter G, Williams GM. Short-and intermediate-term carcinogenicity testing--a review. Part 1: the prototypes mouse skin tumour assay and rat liver focus assay. *Food Chem Toxicol.* 1998 Nov;36(11):979-95. Review.

- Erdei E, Torres SM. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010 Nov; 10(11):1811-23.

- Fadel S, Sarzotti M. Cellular immune responses in neonates. *Int. Rev. Immunol.*, 2000; 19(2-3): 173-93.

- Feldman ED, Pingpank JF, Alexander Jr. R. Regional treatment options for patients with ocular melanoma metastatic to the liver. *Annals of Surgical Oncology* 2004; 11 (3): 290-297.

- Femiano F, Lanza A, Buonaiuto C, Gombos F, Di Spirito F, Cirillo N. Oral malignant melanoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med.* 2008 Aug; 37 (7): 383 - 388.

- Figueiredo CRLV. *Imunopatologia*. In: Pereira Pinto L; Souza L B, Freitas RA et al. *Patologia Basica: sinopse*. Natal: EDUFRN, 1997.

- Finn L, Markovic SN, Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med* 2012; 10:23.

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

- Fujiwara H, Hamaoka T. Antitumor and antimetastatic effects of interleukin 12. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1996;38 Suppl:S22-6.

- Gerlini G, Tun-Kyi A, Dudli C, Burg G, Pimpinelli N, Nestle FO. Metastatic Melanoma Secreted IL-10 Down-Regulates CD1 Molecules on Dendritic Cells in Metastatic Tumor Lesions. *Am J Pathol* 2004; 165:1853-63.

- Germeau C, Ma W, Schiavetti F, Lurquin C, Henry E, Vigneron N, et al. High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after

vaccination with tumor antigens. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 201, No. 2, January 17, 2005; 241–248.

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

- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):851-7.

- Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res* 2010; 70(9):3718–3729.

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

- Guevara-Canales JO, Gutiérrez-Morales MM, Sacsquispe-Contreras SJ, Sánchez-Lihón J, Morales-Vadillo R. Malignant melanoma of the oral cavity. Review of the literature and experience in a Peruvian Population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Dec 6.

- Halliday GM, Le S. Transforming growth factor-beta produced by progressor tumours inhibits, while IL-10 produced by regressor tumours enhances, Langerhans cell migration from skin. *Int Immunol* 2001; 13: 1147–1154.

- Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13, 413-421.

- Hart PH, Jones CA, Finlay-Jones JJ. Monocytes cultured in cytokine-defined environments differ from freshly isolated monocytes in their responses to IL-4 and IL-10. *J Leukoc Biol* 1995; 57 (6): 909-18.

- Hauck AL, Swanson KS, Kenis PJ, Gaskins HR, Schook LB. Twist and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005; 75:58-71.

- Hawes D, Neville AM, Cote RJ. Occult metastasis. *Biomed Pharmacother* 2001.

- Herwig MC, Bergstrom C, Wells JR, Höller T, Grossniklaus HE. M2/M1 ratio of tumor associated macrophages and PPAR-gamma expression in uveal melanomas with class 1 and class 2 molecular profiles. *Exp Eye Res* 2013; 107: 52.

- Heufler C, Koch F, Stanzl U. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol*. 1996; 26:659–668.

- Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994; 76:977- 87. Disponível em: PMID:8137431; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90376-X](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90376-X).

- Hillen F, Baeten CI, van de Winkel A, Creytens D, van der Schaft DW, Winnepenninckx V, et al. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Jan;57(1):97-106.

- Ho TS, Ho YP, Wong WY, Chi-Ming Chiu L, Wong YS, Eng-Choon Ooi V Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother.* 2007; 61(9):578-87. Epub 2007 Sep 14.

- Holdsworth SR, Gan PY. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015; May 4. pii: CJN.07590714.

- Holen E, Winterthun S, Du ZY, Krøvel AV. Inhibition of p38 MAPK during cellular activation modulate gene expression of head kidney leukocytes isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed soy bean oil or fish oil based diets. *Fish Shellfish Immunol.* 2011 Jan;30(1):397-405. doi: 10.1016/j.fsi.2010.11.017.

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

- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 1993; 260:547–549.

- Hu JL, Yang Z, Tang JR. Effects of gastric cancer cells on the differentiation of Treg cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14, 4607-10.

- Humbert L, Lebrun JJ. TGF-beta inhibits human cutaneous melanoma cell migration and invasion through regulation of the plasminogen activator system. *Cell Signal.* 2013; 25(2):490–500.

- Humbert L, Neel JC, Lebrun JJ. Targeting TGF-beta signaling in human cancer therapy. *Trends Cell Mol Biol.* 2010; 5:69–107.

- Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev* 2005; 5:521–31.

- Hussein MR. Genetic pathways to melanoma tumorigenesis *J. Clin. Pathol.* 2004; 57; 797 - 801. Review.

- Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13(2):95–109.

- Ilkovitch D, Lopez DM. Immune modulation by melanoma-derived factors. *Exp Dermatol.* 2008; 17:977-85.

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

- Instituto Nacional de Câncer - INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, [acesso 2015 abr 30]. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2014>.

- Jager E, Hohn H, Necker A. Peptide-specific CD8+ T-cell evolution in vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1. *Int. J. Cancer.* 2002; 98 (3), 376–388.

- Jakobisiak M, Lasek W, Golab J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett.* 2003; 90:103–122.

- Javelaud D, Alexaki VI, Mauviel A. Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21:123-132.

- Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 2001; 6(1):34–55.

- Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. 2009; v.9, n.4, p. 239-252.

- Kanegane C, Sgadari C, Kanegane H, Teruya-Feldstein J, Yao L, Gupta G, Farber JM, Liao F, Liu L, Tosato G. Contribution of the CXC chemokines IP-10 and Mig to the antitumor effects of IL-12. *J Leukoc Biol*. 1998 Sep;64(3):384-92.

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

- Katiyar SK, Challa A, McCormick TS, Cooper KD, Mukhtar H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by green tea polyphenol-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis*. 1999; 20, 2117–2124.

- Katz KA, Jonasch E, Hodi FS, Soiffer R, Kwitkiwski K, Sober AJ, Haluska FJ. Melanoma of unknown primary: experience at Massachusetts General Hospital
Kerker SP, Leonardi AJ, van Panhuys N. Collapse of the tumor stroma is triggered by IL-12 induction of Fas. *Mol Ther*. 2013; 21:1369–1377.

- Kiecker F, Hofmann MA, Audring H, Brenner A, Labitzke C, Sterry W, et al. Large primary meningeal melanoma in an adult patient with neurocutaneous melanosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2007 Jun; 109 (5): 448 - 451.

- Kilinc MO, Aulakh KS, Nair RE. Reversing tumor immune suppression with intratumoral IL-12: activation of tumor-associated T effector/memory cells,

induction of T suppressor apoptosis, and infiltration of CD8+ T effectors. *J Immunol.* 2006; 177:6962–6973.

- Kim BC, Kim HT, Park SH, Cha JS, Yufit T, Kim SJ, et al. Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF- β signalling and decreased TGF- β Type II receptor expression. *J Cell Physiol* 2003; 195: 331-336.

- Kirkin AF, Straten P, Zeuthen J. Differential modulation by interferon gamma of the sensitivity of human melanoma cells to cytolytic T cell clones that recognize differentiation or progression antigens. *Cancer Immunol Immunother.* 1996; 42:203–12.

- Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem* 2004; 279 (29): 30540 - 545.

- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med.* 1989; 170:827–845 3.

- Kouskoff V, Famiglietti S, Lacaud G, Lang P, Rider JE, Kay BK, et al. Antigens varying in affinity for the B cell receptor induce differential B lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 1453–1464.

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

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

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

- Kuhajda FP. Fatty acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. Nutrition 2006; 16 (3): 202-208.

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

- Kuwamoto K, Miyauchi-Hashimoto H, Tanaka K, Eguchi N, Inui T, Urade Y, et al. Possible involvement of enhanced prostaglandin E2 production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group A model mice. J Invest Dermatol. 2000; 114, 241–246.

- Lebrun JJ. The dual role of TGF in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis. ISRN Molecular Biol. 2012; 2012:1–28.

- Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Berger F, Rigal D, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large Bcell lymphoma. Blood 2004;103:3529-34. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-06-1850>.

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

- Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. Annu Rev Immunol. 1998; 16:137-61.

- Levy DE, Darnell Jr JE. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:651–62.

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

- Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*.

- Li JN, Gorospe M, Cherst FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WH et al. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and citotoxic effects modulated by p53. *Cancer Research*. 2001; 61 (4): 1493 - 499.

- Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*. 2008; 134, 392-404.

- Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Lee CS et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Royal College of Pathologists of Australia (Pathology)* 2006; 38(4): 287 - 301.

- Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Lee CS et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Royal College of Pathologists of Australia (Pathology)* 2006; 38(4): 287-301.

- Liang KV, Sanderson SO, Nowakowski GS, Arora AS. Metastatic malignant melanoma of the gastrointestinal tract. *Mayo Clin Proc* 2006; 81 (4): 511-516.
- Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 2000; 127: 117-126.

- Livingstone E, Zimmer L, Vaubel J, Schadendorf D. Current advances and perspectives in the treatment of advanced melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2012; doi: 10.1111/j.1610-0387.2012.07895.x.

- Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science.* 2014; 346:945–9.

- Lollini PL, Bosco MC, Cavallo F, De Giovanni C, Giovarelli M, Landuzzi L, et al. Inhibition of tumor growth and enhancement of metastasis after transfection of the gamma-interferon gene. *Int J Cancer* 1993; 55: 320–329.

- Lopez MV, Adris SK, Bravo AI, Chernajovsky Y, Podhajcer OL. IL-12 and IL-10 expression synergize to induce the immune-mediated eradication of established colon and mammary tumors and lung metastasis. *J Immunol.* 2005 Nov 1;175(9):5885-94.

- Lu S, Archer MC. Fatty acid synthase is a potential molecular target for the chemoprevention of breast cancer. *Carcinogenesis.* 2005; 26(1):153-7. Epub 2004 Sep 9.

- Luedke E, Jaime-Ramirez AC, Bhave N, Roda J, Choudhary MM, Kumar B, et al. Cetuximab therapy in head and neck cancer: immune modulation with interleukin-12 and other natural killer cell-activating cytokines. *Surgery.* 2012; 152:431–440.

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

- Machado J, Ministro P, Araújo R, Cancela E, Castanheira A, Silva A. Primary malignant melanoma of the esophagus: A case report. *World J Gastroenterol*. 2011 Nov 14; 17 (42): 4734 – 4738.

- Mahdavian DB, Veer WM, Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011; 216(7):753-62.

- Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 231 .

- Mapara MY, Sykes M (2004) Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 22:1136–1151.

- Margolin K. Introduction to the role of the immune system in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014 Jun;28(3):537-58. doi: 10.1016/j.hoc.2014.02.005.

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

- Massague J. TGFbeta in cancer. *Cell*. 2008; 134(2):215–30.

- Mayers I & Johnson D - The nonspecific inflammatory response to injury. *Can J Anaesth* 1998; 45: 871-9.

- McWilliams RR, Rao RD, Brown PD, Link MJ, Buckner JC. Treatment options for brain metastases from melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005; 5 (5): 809-820.

- Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR. Cytokines and cardiovascular disease. *J Leukoc Biol.* 2005 Oct;78(4):805-18.

- Mena F. Latest approved therapies for metastatic melanoma: what comes next? *J Skin Cancer.* 2013; 735282.

- Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct; 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.* 2004c; 101(29): 10715-720.

- Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G, et al. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(7): 519-32.

- Miller CHT, Maher SG, Young HA. Clinical use of interferon-gamma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009; 1182, 69–79.

- Miller DM, Flaherty KT, Tsao H. Current status and future directions of molecularly targeted therapies and immunotherapies for melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 2014 Jun;33(2):60-7. Review.

- Mindiola R, Caulejas D, Núñez-Troconis J, Araujo M, Delgado M, Mosquera J. Increased number of IL- 2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix. *Invest Clin,* 2008 Dec; 49(4): 533-45.

- Mocellin S, Marincola FM, Young HA. *J Leukoc Biol.* 2005: 78:1043–1051.

- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11:165–190.

- Nanni P, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Di Carlo E, Cavallo F, et al. Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J Exp Med.* 2001 Nov 5;194(9):1195-205.

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

- Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol.* 2001; 12(6):303-13.

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

- Options *Oncol* 2005; 6 (3):185-93.

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

- Otani T, Nakamura S, Toki M, Motoda R, Kurimoto M, Orita K () Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/ IL-18-treated mice. *Cell Immunol.* 1999; 198:111–119.

- Palmer DC, Chan CC, Gattinoni L. Effective tumor treatment targeting a melanoma/melanocyte-associated antigen triggers severe ocular autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:8061–6.

- Parihar R, Dierksheide J, Hu Y, Carson WE. IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *J Clin Invest*. 2002; 110:983–992.

- Park SY, Seol JW, Lee YJ, Cho JH, Kang HS, Kim IS, et al. IFN-gamma enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. *Eur J Biochem* 2004; 271(21):4222–4228.

- Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, Zimmerman K, et al. Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Mol Med* 2010; 16: 92-101.

- Pawelek J, Chakraborty A, Lazova R, Yilmaz Y, Cooper D, Brash D, et al. Co-opting macrophage traits in cancer progression: A consequence of tumor cell fusion? In: Dittmar T, Zaenker KS, Schmidt A, eds. *Infection and Inflammation: Impacts on Oncogenesis*. Contrib. Microbiol. Basel, Karger. 2006;138-55.

- Pawelek J. Tumor cell fusion as a source of myeloid traits in cancer. *The Lancet Oncology* 2005; 6:988-93. 2.

- Perrot CY, Javelaud D, Mauviel A. *Ann Dermatol* 2013; 25:135–144.

- Perrot CY, Javelaud D, Mauviel A. Insights into the transforming growth factor-beta signaling pathway in cutaneous melanoma. *Ann Dermatol* 2013; 25:135-144.

- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:929–979.

- Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC, et al. The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol*, v. 31, n. 9, p. 1068-1073, 2000.

- Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda F. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Research*. 1996; 56 (12): 2745-747.

- Plataniotis LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(5): 375–386.

- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:71–8.

- Portielje JE, Gratama JW, Ojik HH, et al. IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52:133–144.

- Presti RM, Pollock JL, Dal Canto AJ, et al. Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J Exp Med* 1998; 188:577-588.

- Propper DJ, Chao D, Braybrooke JP. Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2003; 9:84–92.

- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med*. 2013; v.19, n.11, p.1423-1437.

- Raghupathy R, Makhseed M, El-Shazly S, Azizieh F, Farhat R, Ashkanani L. Cytokine patterns in maternal blood after premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol.* 2001 Jul;98(1):122-6.

- Ramont L, Pasco S, Hornebeck W, Maquart FX, Monboisse JC. Transforming growth factor-beta1 inhibits tumor growth in a mouse melanoma model by down-regulating the plasminogen activation system. *Exp Cell Res.* 2003; 291(1):1–10.

- Reiter Z. Interferon—a major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Interferon Res.* 1993; 13:247–257.

- Ribas A, Amarnani SN, Buga GM, Butterfield LH, Dissette VB, McBride WH, et al. Immunosuppressive effects of interleukin-12 coexpression in melanoma antigen gene-modified dendritic cell vaccines. *Cancer Gene Ther.* 2002 Nov;9(11):875-83.

- Ritzenthaler JD, Goldstein RH, Fine A. Regulation of the alpha 1(I) collagen promoter via a transforming growth factor-beta activation element. *J Biol Chem.* 1993;268: 13625-31.

- Rivas JM, Ullrich, SE. The role of IL-4, IL-10, and TNF-alpha in the immune suppression induced by ultraviolet radiation. *J Leukoc Biol.* 1994; 56, 769–775.

- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM et al. Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 1986;83: 4167-71.

- Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner. Electrolyte Metab* 1998; 24: 111-19.

- Rodolfo M, Daniotti M, Vallacchi V. Genetic progression of metastatic melanoma. *Cancer Letters* 2004; 214: 133-147.

- Rogers TI, Holen I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J Transl Med.* 2011; 9: 177.

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

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

- Ruzicka T, Walter JF, Printz MP. Changes in arachidonic acid metabolism in UV-irradiated hairless mouse skin. *J Invest Dermatol.* 1983; 81, 300–303.

- Sabat, R. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev,* 2010; 21(5): p. 331-44.

- Sato T, McCue P, Masuoka K. Interleukin 10 production by human melanoma. *Clin Cancer Res.* 1996; 2:1383–1390.

- Schwarz A, Grabbe S, Riemann H, Aragane Y, Simon M, Manon S, et al. In vivo effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J Invest Dermatol.* 1994; 103, 211–216.

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

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

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

- Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res.* 2008; 101:249–76.

- Sethi G, Shanmugam MK, Ramachandran L, Kumar AP, Tergaonkar V. Multifaceted link between cancer and inflammation. *Biosci. Rep.* 2012; 32, 1-15.

- Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood.* 1996 May 1;87(9):3877-82.

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

- Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 2014;507:366–70.

- Shih CM, Lee YL, Chiou HL, Hsu WF, Chen WE, Chou MC, et al. The involvement of genetic polymorphism of IL-10 promoter in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005; 50:291-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.07.007.66>.

- Sica A, Sacconi A, Bottazzi B, Bernasconi S, Allavena P, Gaetano B, et al. Defective expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma.. *J Immunol.* 2000 Jan 15;164(2):733-8.

- Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3, 807-21.

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

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

- Silva SD, Cunha IW, Rangel AL, Jorge J, Zecchin KG, Agostini M, et al. Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. *Virchows Arch.* 2008 Jul; 453 (1): 57-67.

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

- Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: The roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 2006; 90:1–50.

- Smyth MJ: Type I interferon and cancer immunoediting. *Nat Immunol* 2005, 6:646–648.

- Sommer C, White F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. - Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010; 279-302.

- Spagnolo F, Caltabiano G, Queirolo P. Uveal melanoma. Cancer Treat Rev. 2012 Jan 21.

- Spits H, De Waal Malefyt R. Functional characterization of human IL-10. Int Arch Allergy Appl Immunol 1992; 99:8–15.

- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. Biochem Pharmacol. 2009 Sep 15;78(6): 539- 52.

- Steding CE, Wu ST, Zhang Y, Jeng MH, Elzey BD, Kao C. The role of interleukin-12 on modulating myeloid-derived suppressor cells, increasing overall survival and reducing metastasis, Immunology. 2011; 221–238.

- Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87:6808–6812 2.

- Strasly M, Cavallo F, Geuna M, Mitola S, Colombo MP, Forni G, Bussolino F. IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk. J Immunol. 2001 Mar 15;166(6):3890-9.

- Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. Blood 2001; 97: 192–197.

- Syrjänen S, Naud P, Sarian I, Derchain S, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, et al. Immunosuppressive cytokine interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. *Virchows Arch.* 2009 Dec; 455 (6): 505-15.

- Szala S, Mitrus I, Sochanik A. Can inhibition of angiogenesis and stimulation of immune response be combined into a more effective antitumor therapy? *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59:1449–1455.

- Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of Fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9 (6): 2204-212.

- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2443–54.

- Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, et al. A highly immunogenic tumour transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1486–1490.

- Trapani JA. Tumor-mediated apoptosis of cancer-specific T lymphocytes—reversing the "kiss of death"? *Cancer Cell.* 2002; 2:169–171.

- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003; 19:641–4.

- Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003 Feb;3(2):133-46.

- Trinchieri G. Interleukin-12: A Proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Ann Rev Immunol.* 1995; 13:251-76.

- Trinchieri G. Recognition of major histocompatibility complex class I antigens by natural killer cells. *J Exp Med* 1994; 180. 417–421.

- Tripsianis G, Papadopoulou E, Romanidis K. Overall survival and clinicopathological characteristics of patients with breast cancer in relation to the expression pattern of HER-2, IL-6, TNF-alpha and TGF-beta1. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14, 6813-20.

- Tronnier M, Mitteldorf C. Treating advanced melanoma: current insights and opportunities. *Cancer Manag.* 2014; Res 6: 349–56

- Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene.* 2003 May 19; 22 (20): 3042 - 3052.

- Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, Vrohings M, Nussbaum K, Vom Berg J, Kulig P, Becher B. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ.* 2015 Feb; 22(2): 237-46. doi: 10.1038/cdd.2014.134. Epub 2014 Sep 5.

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

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

- Utikal J, Udart M, Leiter U, Peter RU, Krahn G et al. Additional cyclin D(1) gene Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A, et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res.* 2006; 66:9290-8.

- Varella PPV, Forte WCN. Cytokines: a review. *Rev. Brasileira de Alergia e Imunopatologia.* 2001; 24 (4): 146-154.

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

- 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): 335-39.

- Visser KE, Eichten A, Coussens M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer* 6, 24-37. doi:10.1038/nrc1782.

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

- Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Apr 19;87(8):581-6.

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

- Wang WQ, Zhao XY, Wang HY, Liang Y. Increased fatty acid synthase as a potential therapeutic target in multiple myeloma. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008 Jun; 9 (6): 441-47.

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

- Weber SM, Qi C, Neal Z, Sondel P, Mahvi DM. IL-2 cDNA direct injection: antimetastatic effect from a single injection in murine hepatic metastases model. *J Surg Res*. 2004 Dec;122(2):210-7.

- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003; 83(3):835-70.

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

- Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2013; 369:122–133.

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

- Yoon BS, Kim YT, Kim JW, Kim SH, Kim JH, Kim SW. Expression of human leukocytes antigen-G and its correlation with interleukin-10 expression in cervical carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet*. 2007; 98(1): 48-53.

- Yoshimoto T, Nagai N, Ohkusu K, Ueda H, Okamura H, Nakanishi K. LPS-stimulated SJL macrophages produce IL-12 and IL-18 that inhibit IgE production in vitro by induction of IFN-gamma production from CD3intIL-2R beta + T cells. *J Immunol.* 1998; 161:1483–1492.

- Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa Y, Iwakura Y, Nakanishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon – γ production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:3948-53.

- Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakanishi K.. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 3948 –3953.

- Young HA; Bream JH. IFN-gamma: Recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007; 316, 97– 117.

- Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, et al. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 1997;71:630–7.

- Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells . *J Exp Med.* 1998; 188(12): 2375–2380.

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

- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R.. Nat. Med. 2003;9:964–968.

- Zeytin H, Reali E, Zaharoff DA, Rogers CJ, Schlom J, Greiner JW. Targeted delivery of murine IFN-gamma using a recombinant fowlpox virus: NK cell recruitment to regional lymph nodes and priming of tumor-specific host immunity. J Interferon Cytokine Res 2008; 28(2):73–87.

- Zhang AM, Wang HF, Ji W, Zhang Z, Yan T, Zhang H, Wang FS. Changes of peripheral plasmacytoid dendritic cells and lymphocyte subsets in chronic hepatitis B patients treated with consensus interferon alpha. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2007 Mar;15(3):184-6.

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

- Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin 2007; 45: 27-37.