

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LUCIANA YAMAMOTO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM ORLISTAT
SOBRE A RESPOSTA IMUNE CONTRA MELANOMAS
EXPERIMENTAIS

Dissertação de Mestrado
apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
UNICAMP, para 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 pela aluna, e orientada
pelo Prof. Dr. Edgard Graner.

Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

AL64a Almeida, Luciana Yamamoto de, 1985-
Avaliação do tratamento com Orlistat sobre a resposta imune
contra melanomas experimentais / Luciana Yamamoto de
Almeida. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

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

1. Complexo ácido graxo sintetase. 2. Sistema imunológico. 3.
Imunofenotipagem. 4. Citometria de fluxo. 5. Câncer. I. Graner,
Edgard, 1968- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of the effects of Orlistat on the immune response
against experimental melanomas

Palavras-chave em Inglês:

Fatty acid synthetase complex

Immune system

Immunophenotyping

Flow cytometry

Cancer

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Edgard Graner [Orientador]

Karina Gottardello Zecchin

Ana Lúcia Carrinho Aryroza Rangel

Data da defesa: 27-02-2012

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 27 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata LUCIANA YAMAMOTO DE ALMEIDA aprovada.

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

Prof. Dr. EDGARD GRANER

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

Profa. Dra. KARINA GOTTARDELLO ZECCHIN

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel".

Profa. Dra. ANA LÚCIA CARRINHO AYROZA RANGEL

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **José Carlos e Antonieta**, pelo apoio incondicional às minhas escolhas e por todo amor dedicado a mim.*

*À minha irmã, **Lana**, pelo carinho, amizade e cumplicidade.*

*Aos meus avôs, **Kimio e José**, pela saudade de todos os momentos singulares em minha vida compartilhados
“In Memoriam”*

*Às minhas avós **Ana e Sono**, pelas orações e cuidado imenso.*

*Ao meu esposo **Jorge**, pela arte da convivência e do amor mútuo.*

*Aos **camundongos**, imprescindíveis para concretização deste trabalho.*

*Ao **Professor Dr. Edgard Graner**, agradeço não somente pela grande oportunidade de tê-lo como meu orientador, mas principalmente, pelo exímio exemplo de humildade, sabedoria, paciência e dedicação diária à ciência.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me fortalecer nos momentos de dificuldades e guiar-me pelos caminhos incertos;

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

Ao Prof. Dr. **Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos Profs. Drs. **Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Oslei Paes de Almeida e Alan Roger dos Santos**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo exemplo, convívio e auxílio diários;

À Prof^a. Dr^a. **Renata de Oliveira Mattos-Graner** por viabilizar a realização de experimentos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e por ter me proporcionado aulas dinâmicas e estimulantes, facilitando o aprendizado;

Aos Profs. Drs. **João Santana da Silva e Maria Cristina Roque Antunes Barreira** e à aluna de doutorado **Vânia Sammartino Mariano**, do Departamento de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelas contribuições ao desenvolvimento do trabalho;

À **Fabiana Rossetto de Moraes**, responsável pela Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo auxílio e disponibilidade;

À **CNPq** (Processo 131566/2010-5) pela concessão da bolsa de mestrado;

À **FAPESP** (Processo 57471-7/2008) pelo amparo financeiro a esta pesquisa;

Às Prof^{as} Dr^{as}. **Michelle Agostini e Ana Teresinha** por serem exemplos de profissionais e de mulheres determinadas;

Aos amigos **Marco Antônio, Andréia, Débora, Fabiana, Flávia, Michelle e Rose** por me acolherem e me ensinarem com carinho e sem medir esforços todos os conhecimentos necessários para a realização deste trabalho;

Às amigas do laboratório **Ana Camila, Andréia Bufalino, Andréia Silva, Camilla, Carolina Bitu, Débora, Elizabeth, Fabiana, Isadora, Lays, Lívia, Michelle, Manoela, Priscila, Rose e Sibelle**, pela convivência agradável e ensinamentos valiosos;

Aos amigos da pós-graduação **Alícia, Ana Lúcia, Bruno, Camila Béder, Daniel, Felipe, Fernanda Basso, Fernanda Mariano, Karina, Katya, Lara, Marcondes, Marianne, Mário, Marisol, Patrícia, Renato, Rodrigo, Rogério, Sabino, Sabrina, Victor e Wilfredo**, pelos conhecimentos e momentos de descontração compartilhados;

Ao biólogo, **Sr. Adriano Luís Martins** funcionário do laboratório de Patologia pela disponibilidade em me auxiliar no manuseio dos equipamentos;

Aos funcionários do laboratório de Patologia, **Sr. João Carlos, Luana, Fabiana, Geovania e Valéria** pela gentileza e colaboração.

EPÍGRAFE

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”

Marcelo Camelo

A enzima ácido graxo sintase (FASN), responsável pela síntese endógena de ácidos graxos, está presente em grande quantidade em diversas neoplasias malignas e lesões pré-malignas. Sua inibição farmacológica parece estar relacionada com a morte celular seletiva de células tumorais. Orlistat (Xenical[®]), uma droga anti-obesidade, que possui também propriedades anti-neoplásicas por inibir irreversivelmente FASN, sendo estes efeitos claramente demonstrados em cânceres de mama, próstata, estômago e melanoma. Embora as propriedades antitumorais do Orlistat ocorram devido a um efeito direto sobre as células malignas, até o momento, possíveis mecanismos indiretos sobre o sistema imunológico não foram estudados. Células imunes, como linfócitos T CD8⁺ (LTCD8⁺), células *natural killer* (NK) e células dendríticas (CD), estão envolvidas no processo de defesa antitumoral, por promover a morte de células neoplásicas. Como não há informações na literatura sobre uma possível relação entre FASN e o sistema imunológico, nosso trabalho teve como objetivo principal estudar o efeito da inibição da enzima FASN com Orlistat sobre o fenótipo e porcentagem de LTCD8⁺, células NK e CDs presentes nos tumores primários e suas respectivas metástases para linfonodos mediastínicos, em modelo de melanoma murino (B16-F10 / C57/Bl6). Adicionalmente, avaliou-se o estado de ativação das CDs CD11c⁺ presentes nos linfonodos mediastínicos metastáticos, através da expressão de MHC I (complexo maior de histocompatibilidade de classe I) e das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 na superfície destas células. Através de citometria de fluxo, foram analisadas as porcentagem de LTs CD3⁺CD8⁺, células NK CD3⁻CD49b⁺ e CDs CD11c⁺ nos tumores e metástases. A ativação dos LTCD8⁺ e células NK foi avaliada pela expressão de granzima b e perforina em RNA total obtido dos linfonodos mediastínicos metastáticos, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Além disso, as células NK presentes nas metástases linfonodais também foram avaliadas quanto à expressão do receptor

inibitório Ly49A, através de citometria de fluxo. Após o tratamento com Orlistat, houve redução de cerca de 30 % na quantidade de metástases, em comparação com os grupos controle. Os tumores primários do grupo controle apresentaram um baixo percentual de LTs CD3⁺CD8⁺ (0,36%) e de células NK CD3⁻CD49b⁺ (0,27%). No grupo tratado, não foi possível detectar a presença destas células na massa tumoral, sugerindo uma supressão desta população pelo Orlistat. Além disso, CDs CD11c⁺ não puderam ser avaliadas nestes tumores. Nos linfonodos mediastínicos metastáticos, houve um discreto aumento de CDs CD11c⁺, acompanhado de menor expressão das proteínas de superfície MHC I, CD80 e CD86, além de uma redução percentual das células T CD3⁺CD8⁺ e NK CD3⁻CD49b⁺. A expressão de RNAs mensageiros para granzima b e perforina também foi menor no grupo de camundongos tratados. Finalmente, em relação a Ly49A, sua expressão foi maior nas NKs dos linfonodos metastáticos de animais tratados. Em conjunto, nossos resultados indicam que a inibição de FASN com Orlistat interfere no fenótipo, porcentagem e estado de ativação das células imunológicas intratumorais e dos linfonodos metastáticos, sugerindo possível atividade imunossupressora.

Palavras chave: ácido graxo sintase / orlistat / sistema imunológico / imunofenotipagem / citometria de fluxo / melanoma

ABSTRACT

Fatty acid synthase (FASN), the enzyme responsible for the endogenous synthesis of fatty acids, is highly expressed in several malignant neoplasms and premalignant lesions. Its pharmacological inhibition promotes apoptosis in tumor cells. Orlistat (Xenical[®]), an anti-obesity drug, has anti-neoplastic properties by irreversibly inhibiting FASN, which were demonstrated in malignant neoplasms from breast, prostate and stomach and melanoma. Although the known antitumor properties of Orlistat are consequence of a direct effect on malignant cells, indirect mechanisms on the immune system were not described. Immune cells, such as CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺ TL), natural killer (NK) and dendritic cells (DC) are involved in the defense against cancer cells. Since there is no information in literature about a relationship between FASN activity and the immune system, our work aimed to study the effect of Orlistat on the phenotype and percentage of CD8⁺TL, NK and DC present in the primary tumors and their metastases to mediastinal lymph nodes in a experimental model of spontaneous melanoma metastasis (B16-F10 / C57/BI6). Additionally, we evaluated the activation of CD11c⁺ DCs present in the metastatic mediastinal lymph nodes, through the expression of MHC I (major histocompatibility complex class I) and costimulatory molecules CD80 and CD86 on cell surface. By using flow cytometry, we analysed the effects of Orlistat on the percentage of CD3⁺CD8⁺ TLs, CD3⁻CD49b⁺ NK cells, and CD11c⁺ DCs in primary tumors and lymph node metastases. Activation of CD8⁺ TLs and NK cells was evaluated through the expression of granzyme b and perforin in the metastatic mediastinal lymph nodes by quantitative RT-PCR. In addition, NK cells present in lymph node metastases were also evaluated regarding the expression of Ly49A by flow cytometry. Orlistat was able to reduce in approximately 30% the number of metastatic lymph nodes. Control primary tumors had a low percentage of CD3⁺CD8⁺ TLs (0.36%) and CD3⁻CD49b⁺ (0.27%), which were not detected in the treated tumors, suggesting a suppression of this

population. In addition, CD11c⁺ DCs could not be assessed in both treated and control tumors. Regarding metastatic lymph nodes, there was a slight increase of CD11c⁺ DCs, associated with a lower expression of the surface proteins MHC I, CD80 and CD86. CD3⁺CD8⁺ TLs and CD3⁻CD49b⁺ NK cells were reduced in the metastases from the treated animals. Moreover, the expression of granzyme b and perforin was lower in the metastases of treated mice. Finally, the expression of Ly49A on NK cells was higher in metastatic lymph nodes of treated animals. Taken together, our results indicate that inhibition of FASN with Orlistat changes the phenotype, percentage and activation state of intratumoral and lymph node immune cells, suggesting an immunosuppressive activity.

Key words: fatty acid synthase / orlistat / immune system / immunophenotyping / flow cytometry / melanoma

LISTA DE ABREVIATURAS

AG: Ácidos graxos

APC: *allophycocyanin* - alofococianina

cDNA: DNA complementar

CD: Célula dendrítica

CDc: Célula dendrítica convencional

CDp: Célula dendrítica plasmocitóide

CDreg: Célula dendrítica reguladora

DMSO: Dimetil sulfóxido

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* - Ácido etileno diamino tetracético

EGF: *Epidermal Growth Factor*- Fator de crescimento epidérmico

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

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

FASN: *Fatty acid synthase* - Ácido graxo sintase

FBS: *Fetal Bovine Serum* - Soro fetal bovino

FITC: *Fluorescein isothiocyanate* - Isotiocianato de fluoresceína

FSC: *Foward scatter* - Complexidade celular

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* - Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos

HE: Hematoxilina e eosina

HLA: *Human leukocyte antigen* - Antígeno leucocitário humano

IDO: *Indoleamine 2,3 - dioxygenase*

IFN: *Interferon*

IL: Interleucina

kDa: *Kilodalton* - Quilodaltons

LB: Linfócito B

LCT: Leucotrieno

LN: Linfonodo
LNS: Linfonodo Sentinela
LT: Linfócito T
LTC: Linfócito T citotóxico
LTCD8⁺: Linfócito T CD8⁺
LTCD4⁺: Linfócito T CD4⁺
LTreg: Linfócito T regulador
MDSC: *Myeloid-derived suppressor cells* - Células supressoras derivadas mielóides
MEK: *Mitogen-activated protein / ERK* - Proteína ERK ativada por mitógeno
MHC: *Major Histocompatibility complex* - Complexo Maior de Histocompatibilidade
mRNA: RNA mensageiro
NK: *Natural Killer*
PBS: *Phosphate Buffered Saline* - Solução salina tamponada com fosfato
PCR: *Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase
PE: *Phicoeritrin* - ficoeritrina
PerCP: *Peridinin-chlorophyll-protein complex*
PG: Prostaglandina
PI3K: *Phosphatidylinositol - 3 - kinase* - Fosfatidilinositol - 3 - quinase
RNAi: RNA de interferência
RT-PCR: *Reverse transcriptase-PCR*
SREBP: *Sterol regulatory element binding proteins*
SSC: *Side Scatter* - Tamanho celular
TAA: *Tumor-associated antigen* - Antígenos associados a tumores
TBX: tromboxano
TIL: Tumor infiltrating lymphocytes - Linfócitos infiltrados em tumor
TNF: *Tumor necrosis factor* - Fator de necrose tumoral
UV: Ultravioleta
xg: Força centrífuga

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Ácido graxo sintase (FASN) e o câncer	5
2.2. Inibidores de FASN	9
2.3. Resposta imune antitumoral	12
2.4. Mecanismos de evasão tumoral	18
2.5. Melanoma	20
2.6. Resposta imune ao melanoma mediada por células dendríticas (CD)	22
2.7. Resposta imune ao melanoma mediada por linfócitos T CD8 ⁺ (LTCD8 ⁺)	27
2.8. Resposta imune ao melanoma mediada por células <i>Natural Killer</i> (NK)	31
3. OBJETIVOS	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Cultura de células	39
4.2. Preparo das soluções de Orlistat	40
4.3. Modelo animal de metástases espontâneas de melanoma	40
4.4. Isolamento de células dos tecidos tumorais primário e metastático	41
4.5. Imunofenotipagem de células obtidas de linfonodos mediastínicos e de tumores primários intraperitoneais	43
4.6. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR)	50
4.6.1. Extração de RNA total	50
4.6.2. Gel analítico de agarose para RNA	51
4.6.3. Reação de Transcrição Reversa (RT)	52
4.6.4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)	52
4.7. Coloração Oil Red “O”	53
4.8. Análise estatística	54

5. RESULTADOS	55
5.1. Efeito do tratamento com Orlistat nos melanomas experimentais	55
5.2. Análise das células imunes presentes nos tumores primários e linfonodos metastáticos	59
5.3. Efeito do Orlistat sobre a expressão dos RNAs mensageiros de granzima b e perforina nos linfonodos mediastínicos metastáticos	64
5.4. Comprovação da inibição de FASN pelo Orlistat	65
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXO I: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa animal	127

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico tem um importante papel na identificação, prevenção e defesa contra tumores malignos. Células neoplásicas expressam moléculas denominadas antígenos associados a tumores (TAA), não encontradas em células normais. As células imunes reconhecem os TAAs como não próprios e desenvolvem uma resposta antitumoral (revisado por Pandolfi *et al.*, 2011). As respostas imunes são mediadas por componentes do sistema inato, tais como células dendríticas (CD), *natural killer* (NK) e macrófagos, e por componentes do sistema adaptativo, linfócitos T (LT) e B (LB) (revisado por Akira, 2011). Entretanto, os tumores desenvolvem vários mecanismos de escape ao reconhecimento pelo sistema imune, tornando-o ineficaz devido a mudanças na antigenicidade tumoral ou recrutamento de células capazes de suprimir a resposta imunológica (Kimura *et al.*, 2007; Shurin *et al.*, 2012). Dentre os diversos tipos de tumores malignos, o melanoma destaca-se pela facilidade de disseminar-se através de metástases (revisado por Shackleton & Quintana, 2010) e por apresentar resistência ao tratamento com diversos quimioterápicos (Soengas & Lowe, 2003). Nos últimos anos, houve, na população mundial, um aumento no número de casos registrados de melanoma, quando comparado a outros tipos de câncer de pele não-melanoma (Riker *et al.*, 2010). O melanoma oral apresenta comportamento extremamente agressivo, prognóstico ruim e taxa de sobrevivência de cinco anos variando entre 10 a 25%. O atraso no reconhecimento desses tumores em estágios iniciais tem resultado no diagnóstico em estágios avançados (revisado por Shen *et al.*, 2011). Assim, seriam interessantes estratégias de sensibilização das células neoplásicas à ação do sistema imune. Nesse sentido, estudos sugerem que a ativação do sistema imune inato e adaptativo a partir da utilização de imunoterápicos tem obtido resultados benéficos devido ao controle da proliferação de células de melanoma (Kirkwood *et al.*, 2006; Tarhini *et al.*, 2010; Morello *et al.*, 2011).

A ácido graxo sintase (FASN) é a enzima responsável pela síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa, a partir dos precursores malonil-CoA e acetil-CoA (Baron *et al.*, 2004). A expressão elevada de FASN está intimamente associada com a progressão tumoral em diversos tipos de tumores, tais como carcinomas de mama, próstata e melanoma (Bershtein *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2006; de Andrade *et al.*, 2011). Inibidores da atividade de FASN, como cerulenina e seu análogo sintético 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). Entretanto, estas drogas apresentam outros alvos moleculares tais como CPT (carnitina palmitoiltransferase) (Thupari *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005) e ACC (acetil-CoA carboxilase) (Jochen *et al.*, 1995) e, portanto, antagonistas de FASN com maior seletividade são necessários (Thupari *et al.*, 2002). Orlistat (Xenical[®]), uma droga utilizada no tratamento contra a obesidade, também apresenta propriedades anti-neoplásicas por ser capaz de bloquear seletivamente a função tioesterase da FASN, responsável pela liberação do palmitato (Kridel *et al.*, 2004). Assim como cerulenina e C75, Orlistat tem efeitos anti-proliferativos, demonstrados em células de câncer de mama e próstata (Menendez *et al.*, 2004a). Em recente estudo realizado por nosso grupo (Carvalho *et al.*, 2008), células de melanoma B16-F10 foram injetadas intraperitonealmente em camundongos C57/Bl6, resultando no desenvolvimento de metástases espontâneas para os linfonodos mediastínicos. O tratamento destes animais com Orlistat reduziu em 50% o número de metástases linfonodais e inibiu a proliferação destas células neoplásicas em cultura.

O objetivo da imunoterapia no câncer é impedir o crescimento do tumor através da ativação das respostas imunes. Um exemplo disso é representado por estudos avaliando vacinas imunológicas (Germeau *et al.*, 2005), bem como medicamentos quimioterápicos mais específicos e capazes de estimular a resposta imune (Mittendorf *et al.*, 2006). Uma vez que não existem estudos prévios avaliando uma possível relação entre o Orlistat e seus efeitos nas células do sistema imune, o objetivo deste trabalho foi verificar se a inibição da atividade

de FASN com Orlistat interfere no perfil fenotípico e na porcentagem das células do sistema imunológico. Para isto, utilizamos citometria de fluxo para a imunofenotipagem das células imunes presentes em tumores primários e nas suas respectivas metástases para linfonodos mediastínicos de camundongos C57/Bl6, nos quais as células de melanoma B16-F10 foram inoculadas na cavidade peritoneal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ácido graxo sintase (FASN) e o câncer

Ácidos graxos (AG) são constituintes essenciais de todas as membranas lipídicas biológicas, importantes também para o metabolismo energético, para a acilação de proteínas e para os mecanismos de transdução de sinais e de regulação da expressão gênica (Menendez & Lupu, 2007; Zeng *et al.*, 2008). Há duas fontes de AG para o metabolismo animal: a dieta e a síntese endógena através da enzima FASN. Estruturalmente, em mamíferos, FASN é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas multifuncionais (~250 kDa cada) que contém, em cada uma delas, sete diferentes sítios catalíticos sequencialmente organizados (Brink *et al.*, 2002). FASN catalisa a síntese do ácido graxo saturado palmitato a partir da condensação dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA, utilizando nicotinamida adenina 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.*, 2011).

FASN é bastante expressa no ciclo endometrial em fase proliferativa, durante a embriogênese, nos pulmões de fetos em desenvolvimento, no período de lactação, bem como em fígado e tecido adiposo, sendo importante em vários processos biológicos (Chirala *et al.* 2001, Li *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.* 2002, Menendez & Lupu, 2007). Apesar disso, na maioria dos tecidos normais humanos, a síntese de AG *de novo* é usualmente suprimida e a expressão de enzimas lipogênicas é mantida a níveis baixos, uma vez que a maior parte dos AG usados pelas células provém da dieta (Kuhajda, 2000; Zeng *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2008). Em contraste com a maioria das células normais, a expressão de FASN é elevada em uma variedade de neoplasias humanas, uma vez que esta enzima tem participação na tumorigênese por interferir na proliferação celular, possivelmente

por alterar o processo de incorporação de AG nas membranas lipídicas (Wang *et al.*, 2001a). Alta expressão de FASN já foi evidenciada em câncer de mama (Alò *et al.*, 1996; Alò *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008; Bershtein *et al.*, 2009), próstata (Shurbaji *et al.*, 1992; Epstein *et al.*, 1995; Shurbaji *et al.*, 1996; Swinnen *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2006), ovário (Alò *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2010, Uddin *et al.*, 2011), endométrio (Pizer *et al.*, 1998b; Sebastiani *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001; Orita *et al.*, 2010), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2006), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002, Visca *et al.*, 2004), bexiga (Visca *et al.*, 2003), carcinoma de células renais (Horiguchi *et al.*, 2008a), carcinomas espinocelulares bucais (CECs) (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010), carcinoma colorretal (Rashid *et al.*, 1987; Ogino *et al.*, 2009), mieloma múltiplo (Wang *et al.*, 2008), melanomas (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005; de Andrade *et al.*, 2011), pâncreas (Alo *et al.*, 2007; Witkiewicz *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011), tireóide (Vlad *et al.*, 1999), sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003), bem como em linfoma não-Hodgkin (Uddin *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstram que a alta expressão de FASN em células neoplásicas, nas quais a produção de AG é altamente dependente da lipogênese *de novo*, está correlacionada com progressão tumoral, agressividade, metástase e, conseqüentemente, pior prognóstico para o paciente (Alo *et al.*, 2000; Innocenzi *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2004; Takahiro *et al.*, 2003; Horiguchi *et al.*, 2008a; Ogino *et al.*, 2009). O melanoma ocorre em cerca de 90% dos casos na pele, mas também pode afetar mucosas, tais como cavidade oral e esôfago e, menos frequentemente, meninges, olhos, útero e sistema nervoso central (Prasad *et al.*, 2002; Femiano *et al.*, 2008, Simões *et al.*, 2011, Jaiswal *et al.*, 2011). Em melanomas cutâneos, a expressão de FASN tem sido associada a maiores valores no índice de Breslow e, conseqüentemente, à maior taxa de recorrência, metástase e pior prognóstico (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005).

A regulação da transcrição do gene que codifica FASN (**Figura 1A**) em células neoplásicas é, aparentemente, um dos mecanismos mais importantes no

controle da produção desta enzima (Kuhajda, 2006; Menendez & Lupu, 2007). Dois mecanismos principais já foram descritos: a via do fator de crescimento epidérmico (EGF), através dos receptores EGFR e ErbB2, e a dos hormônios esteróides, incluindo estrógeno, progesterona, andrógenos e seus respectivos receptores (Swinnen *et al.*, 2000; Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2004c; Zhang *et al.*, 2005; Mashima *et al.*, 2009). Estas moléculas atuam através das vias de sinalização fosfatidilinositol - 3 - quinase (PI3K-AKT) e quinases regulatórias de sinais extra-celulares (ERK1/2) da cascata MEK (proteína ERK ativada por mitógeno), as quais regulam a expressão de FASN através da modulação da expressão e/ou maturação nuclear de proteínas SREBP1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*) (Menendez & Lupu, 2007). Eberhard *et al.* (2011) demonstraram que o silenciamento de SREBP1c, através de RNA de interferência (RNAi), foi capaz de restaurar a sensibilidade de células de linhagem HeLa, derivadas de câncer de colo de útero, aos mecanismos de apoptose via receptores de morte celular Fas - Fas ligante, sugerindo que isto possa estar relacionado à inibição da expressão de FASN. Entretanto, recentes estudos têm mostrado que a expressão de FASN envolve outros fatores de transcrição, tais como a família das proteínas p53 e *SPOT14* (proteína nuclear relacionada à lipogênese), a última com altos níveis de expressão em cânceres de mama (D'Erchia *et al.*, 2006; Martel *et al.*, 2006). O estresse do microambiente tumoral também interfere na expressão de FASN. Tumores sólidos comumente apresentam um microambiente patofisiológico único, caracterizado por hipóxia, baixo pH e privação de nutrientes, o qual é hostil e ativa várias vias de sinalização que promovem a progressão tumoral e afetam a expressão de FASN em células neoplásicas (Menendez & Lupu, 2007; Furuta *et al.*, 2008).

Além dos fatores envolvidos na transcrição, um segundo e menos estudado mecanismo que regula a produção de FASN é o controle pós-traducional (**Figura 1B**), que pode contribuir para a expressão aumentada desta em células tumorais. No câncer de próstata, a enzima desubiquitinante USP2a interage com FASN, removendo etiquetas de ubiquitina de moléculas já marcadas para a degradação

no proteossomo 26S, evitando assim que FASN seja degradada e aumentando, conseqüentemente, sua meia-vida (Graner *et al.*, 2004).

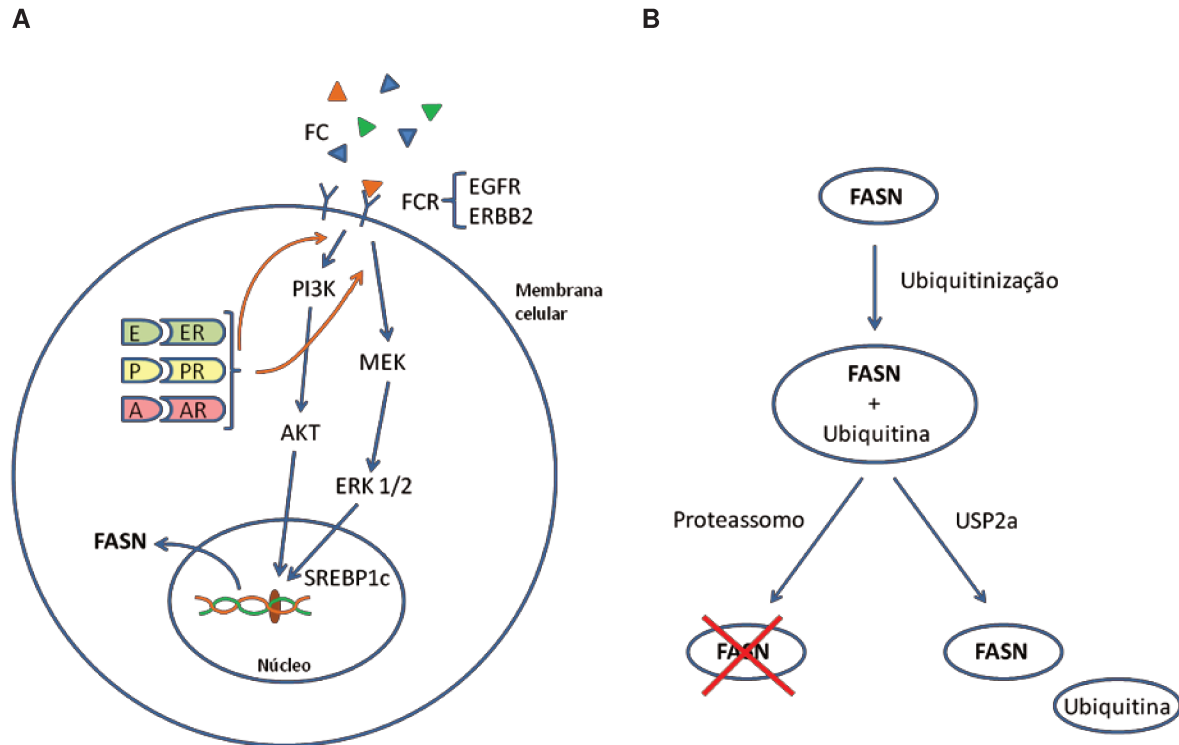


Figura 1: Duas principais vias da regulação da produção de FASN em tumores malignos. (A) Na superfície das células tumorais, fatores de crescimento (FC) dependentes ou independentes de autofosforilação de receptores tirosina-quinase, tais como fator de crescimento epidérmico (EGFR) e ERBB2, levam à ativação da cascata de transdução de sinais de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) - AKT e quinases regulatórias de sinais extra-celulares (ERK 1 e ERK2). Além disso, hormônios esteróides, incluindo estrógeno (E), progesterona (P) e andrógenos (A), ligados aos seus respectivos receptores (R) também podem desencadear mecanismos semelhantes. A expressão e/ou maturação nuclear de proteínas SREBP1c ativa a expressão de FASN. As ligações entre FC - FCR e entre hormônios esteróides e seus receptores (E-ER, P-PR, A-AR) convergem nas cascatas PI3K - AKT e MEK (proteína ERK ativada por mitógeno) - ERK, amplificando as respostas de expressão de FASN em células neoplásicas. **(B)** A expressão de FASN associada a tumores pode também ser modificada no nível pós-traducional, através da interação com USP2a, isopeptidase que remove a ubiquitina de FASN e a estabiliza (modificado a partir de Menendez & Lupu, 2007).

Apesar das evidências apontando a síntese endógena de AG como essencial para a sobrevivência e proliferação das células malignas, não se conhece até o momento quais são os mecanismos biológicos que a conectam com o desenvolvimento tumoral. Uma síntese adicional de AG de cadeias longas

gerados pela FASN parece ser requerida para a biogênese das membranas de células tumorais em rápida divisão, auto-sobrevivência e resistência a drogas, a despeito do nível de lipídios circulantes (Hannun & Obeid, 2002; Flavin *et al.* 2011). Entretanto, isto pode causar alterações na composição lipídica destas membranas, com profundos efeitos em várias vias de transdução de sinais (Baron *et al.*, 2004).

Portanto, FASN regula vias de transdução de sinais que controlam a proliferação e favorecem a sobrevivência de células tumorais, o que pode favorecer o desenvolvimento, manutenção e progressão metastática das neoplasias malignas humanas (Menendez & Lupu, 2007).

2.2. Inibidores de FASN

O bloqueio da lipogênese *de novo* através de inibidores de FASN em células derivadas de neoplasias malignas leva a um aumento nas taxas de morte por apoptose, como já foi demonstrado em mama (Pizer *et al.*, 1996; Pizer *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2004a; Menendez *et al.*, 2005a; Bandyopadhyay *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2011), próstata (Furuya *et al.*, 1997; Brusselmans *et al.*, 2003; De Schrijver *et al.*, 2003), ovário (Uddin *et al.*, 2011), endométrio (Menendez *et al.*, 2004b), estômago (Dowling *et al.*, 2009), intestino (Murata *et al.*, 2010; Chuang *et al.*, 2011), rim (Horiguchi *et al.*, 2008b) e melanoma (Ho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin *et al.*, 2011). Embora poucos desses inibidores sejam específicos para FASN, a relevância desta enzima como um alvo potencial para o tratamento oncológico tem sido confirmado através de estudos com a utilização de RNA de interferência (RNAi) (De Schrijver *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2004b; Lupu & Menendez, 2006, Knowles *et al.*, 2008; Zhan *et al.*, 2008; Migita *et al.*, 2009; Uddin *et al.*, 2011). Assim, devido à expressão diferencial de FASN entre tecidos normais e neoplásicos, os inibidores farmacológicos de FASN podem atuar preferencialmente sobre as células neoplásicas. De fato, em modelos xenográficos, inibidores de FASN retardam o

crescimento tumoral sem danos evidentes às células saudáveis (Menendez & Lupu, 2007; Wang *et al.*, 2008).

A cerulenina ([2R, 3S]-2,3-epoxi-1-oxo-7,10-trans,transdodecadienamida) é um produto natural do fungo *Cephalosporium ceruleans* capaz de inibir a síntese de AG por bloquear irreversivelmente a atividade de FASN (Omura, 1976; Pizer *et al.*, 1996). Tal bloqueio ocorre através de uma ligação covalente no sítio ativo β -cetoacil sintase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda *et al.*, 2000). No entanto, a aplicação clínica da cerulenina é limitada devido a sua instabilidade química, causada pela presença de um grupo epóxi extremamente reativo (Lupu & Menendez, 2006).

O C75, que não apresenta o grupo reativo epóxi, é formado por uma cadeia de 7 carbonos (α -metileno- γ -butirolactona) e possui os mesmos efeitos inibitórios da cerulenina sobre a atividade de FASN, com a vantagem de ser mais estável e, portanto, ter melhor efeito *in vivo* (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Entretanto, o tratamento com C75 causa rápida perda de peso em diversos animais de laboratório por inibir a expressão do neuropeptídeo Y (NPY), responsável por estimular a ingestão de alimentos através de mecanismos independentes da ação de leptina (hormônio inibidor de NPY) (Loftus *et al.*, 2000; Wortman *et al.*, 2003), o que aparentemente impede seu uso como droga anti-tumoral. Além disso, tanto a cerulenina quanto o C75 apresentam outros alvos moleculares, tais como CPT (carnitina palmitoiltransferase) (Thupari *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005) e ACC (acetil-CoA carboxilase) (Jochen *et al.*, 1995). Portanto, é necessário o estudo de antagonistas com maior seletividade e mecanismos de ação distintos.

Orlistat (Xenical[®]) é um derivado semi-sintético da lipstatina, aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA) para o tratamento da obesidade através da inibição irreversível de lipases gástricas e pancreáticas (Guercioli *et al.*, 1997). Esta droga também atua com um inibidor seletivo da função tioesterase da FASN, responsável pela liberação do palmitato (Kridel *et al.*, 2004). Alguns trabalhos demonstraram que o Orlistat possui efeito anti-proliferativo e anti-tumoral em células de câncer de mama e de próstata, em modelos xenográficos (Menendez *et*

al., 2004a; Knowles *et al.*, 2004). Menendez *et al.* (2004 a, 2005a) demonstraram que o tratamento de células derivadas de carcinoma de mama (SK-Br3) e de estômago (NCI-N87) com Orlistat causa um bloqueio do ciclo celular nas fases G0/G1, além de um aumento nos índices apoptóticos. Reforçando estes dados, um estudo realizado por nosso grupo (Carvalho *et al.*, 2008), no Laboratório de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP, demonstrou que o uso de Orlistat no tratamento de camundongos portadores de melanomas experimentais intraperitoneais provocados pela injeção de células B16-F10 reduziu em cerca de 50% o número das metástases nos linfonodos mediastínicos. Com o intuito de se investigar os mecanismos biológicos envolvidos neste processo, Zecchin *et al.* (2011) demonstraram que a inibição de FASN com cerulenina ou Orlistat reduz o crescimento e induz apoptose nas células de melanoma B16-F10, através da ativação das caspases -9 e -3 e liberação de citocromo c, mas independente da ativação de p53 e da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Entretanto, apesar dos resultados positivos acima mencionados, este medicamento apresenta algumas limitações farmacológicas, tais como: baixa solubilidade, aumento da permeabilidade celular, baixa estabilidade metabólica e reduzida absorção por via oral (Flavin *et al.*, 2011). Portanto, uma nova formulação endovenosa ou com aumento da bioviabilidade oral seria necessária para o tratamento de neoplasias humanas com Orlistat (Eberhard *et al.*, 2011).

Outros inibidores de FASN vêm sendo utilizados em estudos contra o câncer. O triclosan (5-cloro-2-[2,4-diclorofeno]fenol), capaz de bloquear a atividade de FASN pela inibição do domínio enoil redutase (Liu *et al.*, 2002; Lupu & Menendez, 2006), e o EGCG (*epigallocatechin-3-gallate*), componente do chá verde com atividade comparável ao C75 por bloquear o sítio β -cetoacil redutase, são capazes de reduzir as formas ativas das proteínas oncogênicas ErbB2, AKT (proteína quinase B) e ERK1/2 (Puig *et al.*, 2008; Wang & Tian, 2001b). Visando redução de efeitos colaterais e aumento da eficácia dos inibidores de FASN, foram recentemente desenvolvidos os antagonistas C93 (Ueda *et al.*, 2009; Orita *et al.*, 2010), C247 (Alli *et al.*, 2005) e FAS31 (Wang *et al.*, 2009). Contudo, apesar de

inibirem o crescimento tumoral em carcinomas de pulmão (C93), mama (C247) e ovário (FAS31) em modelos xenográficos, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação dessas drogas (Flavin *et al.*, 2011).

Apesar de promissores, os estudos que visam a inibição farmacológica de FASN como uma forma de quimioterapia para o tratamento de neoplasias malignas devem ser interpretados com cautela. Está demonstrado que o bloqueio de FASN *in vivo* pode causar efeitos colaterais como anorexia e perda de peso (Clegg *et al.*, 2002), além de apresentar potencial efeito teratogênico (Chirala *et al.*, 2003). Além do mais, um estudo do nosso grupo mostrou que cerulenina é capaz de inibir o crescimento de fibroblastos humanos normais em culturas primárias (Almeida *et al.*, 2005), sugerindo que a produção endógena de ácidos graxos não seja essencial somente para as células malignas.

2.3. Resposta imune antitumoral

O sistema imunológico é composto por um complexo arranjo de células e moléculas que possuem como principal função manter a integridade do organismo, através da eliminação de microrganismos e substâncias que representem risco à saúde do hospedeiro. Funcionalmente, a resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa (Janeway & Medzhitov, 2002). A resposta imune inata é composta por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis produzidas por estas, que possuem um número limitado de receptores (Hazlett *et al.*, 2011). Suas reações são rápidas e padronizadas contra diferentes estímulos nocivos ao organismo, independentemente de contato prévio com células apresentadoras de antígenos (Antigen - presenting cells - APC) (Medzhitov & Janeway, 2000). De uma maneira geral, pode-se dizer que os mecanismos que compõem a resposta inata funcionam como gatilho para que a resposta imune adaptativa, segunda linha de defesa caracterizada pela especificidade aos antígenos, diversidade, memória e reconhecimento de moléculas estranhas, seja ativada (Andersen *et al.*, 2006).

Dentre as células da imunidade inata, os papéis desempenhados por células *Natural Killer* (NK) e células dendríticas (CD) têm sido amplamente investigados na resposta contra o desenvolvimento de neoplasias malignas (Fernandez *et al.*, 1999; Ferlazzo & Münz, 2004; Walzer *et al.*, 2005; Hamerman *et al.*, 2005; Moretta *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011). Além das células NK e CD, os linfócitos T (LT) também têm sido fortemente associados à imunidade específica contra células malignas (Naito *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2001; Nagorsen *et al.*, 2003; Santomasso *et al.*, 2007; Mempel & Bauer, 2009; Bonilla & Oettgen, 2010). As CDs, consideradas potentes APCs, são importantes na iniciação e regulação das respostas imunes, pois estabelecem uma conexão entre o sistema imune inato e o adaptativo. Isto ocorre porque as interações bidirecionais entre células NK e CDs da resposta inata resultam inicialmente em ativação recíproca, promovendo, em seguida, a sensibilização de LT e LB da resposta imune adaptativa pelas CDs (revisado por Granucci *et al.*, 2003).

O sucesso da progressão tumoral é sustentado pelo microambiente tecidual. Embora várias células imunes e efetoras sejam recrutadas para o sítio tumoral, suas funções antitumorais são geralmente suprimidas, por sinais emitidos pelo tumor ou células imunológicas reguladoras (Whiteside, 2008). O desenvolvimento e a manutenção das respostas imunes antitumorais dependem da atividade de CDs convencionais (CDcs), LT citotóxicos (LTCs), células NK, macrófagos M1 e neutrófilos N1, que podem, em conjunto, exterminar as células neoplásicas e suprimir a angiogênese tumoral (Shurin *et al.*, 2012). Em contrapartida, no microambiente tumoral, estas células ou seus precursores podem ser diferenciados em células imunes reguladoras com atividades pró-tumorais. Dentre estas células, incluem-se: macrófagos M2, neutrófilos N2, MDSCs (*Myeloid-derived suppressor cells*), CD reguladoras (CDregs) e LTregs, associadas ao processo de inibição da atividade imune antitumoral, manutenção de sua atividade reguladora, secreção de fatores de crescimento e estímulo para invasão e metástase tumoral (**Figura 2**) (Jaiswal *et al.*, 2010; Gregory *et al.*, 2011; Piccard *et al.*, 2011; Ueha *et al.*, 2011; Shindo & Yoshida, 2010; Shurin *et al.*, 2012;

Geissmann *et al.*, 2010). Assim, o sistema imune tem potencial tanto para promover quanto atrasar o início ou impedir a progressão tumoral e, desta forma, a eficiência da imunovigilância depende do equilíbrio entre estes componentes de ação oposta (revisado por de Visser *et al.*, 2006; Ostrand-Rosenberg, 2008) (**Tabela 1**).

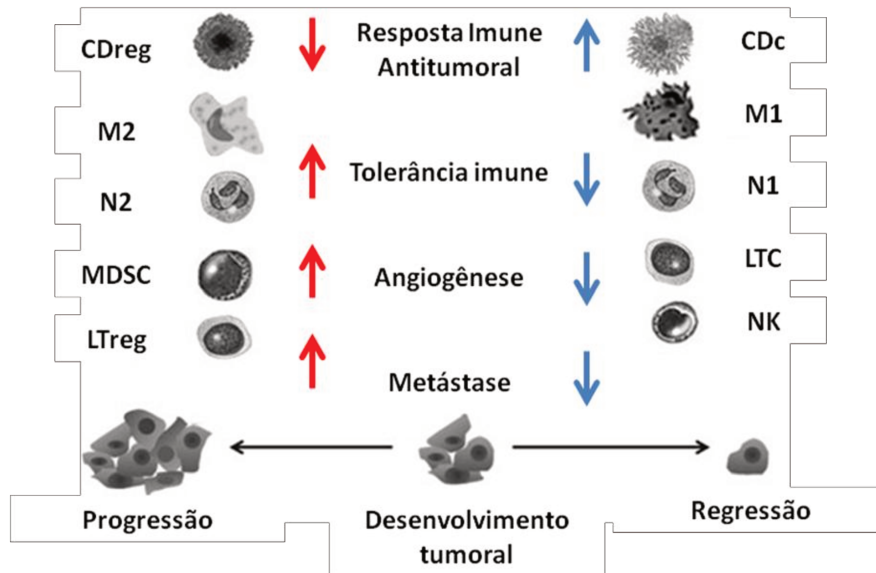


Figura 2: Células imunes com atividades pró e antitumorais. No microambiente tumoral, células imunes, tais como CDc, M1, N1, LTC e NK, exercem atividades antitumorais por apresentarem baixa tolerância, suprimirem mecanismos de angiogênese e controlarem a disseminação metastática. Em contrapartida, fatores secretados pelas células neoplásicas podem provocar a diferenciação destas células imunes em subtipos reguladores, tais como CDreg, M2, N2, MDSC e LTreg, que contribuem para o processo de progressão e invasão tumoral (modificado a partir de Shurin *et al.*, 2012).

Tabela 1: Células imunes e suas funções no microambiente tumoral

Célula	Função	Referências
CDc	APC responsável pela indução da resposta imune antitumoral específica, através da estimulação de LTCs.	Shurin <i>et al.</i> , 2006; Robson <i>et al.</i> , 2010
CDreg	Bloqueia a proliferação de LTs virgens, CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , além de ativar LTregs e estimular a neovascularização intratumoral.	Shurin <i>et al.</i> , 2012; Tisch, 2010
LTC	Célula efetora capaz de lisar células tumorais indiretamente através da liberação de citocinas pró-apoptóticas (TNF- α e IFN- γ) e diretamente pela degranulação de granzima e perforina ou pela via receptor de morte celular Fas - FasL.	Andersen <i>et al.</i> , 2006; Bergmann-Leitner & Abrams, 2000
LTreg	Induz tolerância a tumores e suprime a função de LTCs e NKs, através de citocinas inibitórias (ex: IL-10, TGF- β), e APCs, pela inibição de moléculas co-estimulatórias.	Cao, 2010; Nishikawa & Sakaguchi, 2010; Mougiakakos <i>et al.</i> , 2010
NK	Linfócito do sistema imune inato envolvido no reconhecimento e eliminação de tumores e de suas metástases. O reconhecimento de células <i>non-self</i> ocorre principalmente por alterações na expressão de MHC I.	Chung <i>et al.</i> , 2008; Lee & Gasser, 2010; Stojanovic & Cerwenka, 2011
M1	Subtipo de macrófago que produz citocinas pró-inflamatórias e apresenta funções citotóxicas antitumorais.	Sica <i>et al.</i> , 2008; Heusinkveld & van der Burg, 2011
M2	Subtipo de macrófago que promove angiogênese, crescimento tumoral e metástase.	Sica <i>et al.</i> , 2006; Mantovani <i>et al.</i> , 2002; Jaiswal <i>et al.</i> , 2010
N1	Subtipo de neutrófilo associado à capacidade de lise e inibição do crescimento tumoral.	Piccard <i>et al.</i> , 2011; Mantovani <i>et al.</i> , 2009
N2	Subtipo de neutrófilo pró-tumoral. Na presença de TGF- β e IFN- β , N1 pode diferenciar-se em N2.	Fridlender <i>et al.</i> , 2009
MDSc	Células mielóides imaturas precursoras de macrófagos, CD8 e granulócitos. Apresenta funções imunossupressoras, regulando respostas de LTs, NK, CD8, macrófagos e promovendo o desenvolvimento de LTregs.	Zamarron <i>et al.</i> , 2011; Mantovani, 2010; Fujimura <i>et al.</i> , 2010

Há consideráveis evidências na literatura indicando que o sistema imunológico pode reconhecer e destruir células tumorais, decorrentes da ocorrência natural de respostas imunes contra os antígenos associados a tumores em pacientes com câncer (Germeau *et al.*, 2005). Clemente *et al.* (1996), revisaram 285 casos de melanomas cutâneos primários em fase de crescimento vertical e demonstraram que espessuras reduzidas e aumento dos LTs intratumorais são fatores prognósticos significantes e independentes. Dudley *et al.* (2002) relataram que a transferência de LTs reativos para pacientes portadores de melanoma metastático resultou em regressão tumoral, associada a destruição auto-imune de melanócitos. Ainda, estudos envolvendo animais e humanos imunocomprometidos descrevem que estes geralmente são susceptíveis ao crescimento espontâneo de tumores (Sheil, 1986; Birkeland *et al.*, 1995; Penn *et al.*, 1996; Dunn *et al.*, 2002; Kauffman, 2006). Camundongos deficientes em células NK foram mais susceptíveis a apresentarem formação espontânea de tumores e tiveram maiores taxas de crescimento de tumores implantados, quando comparados com camundongos imunocompetentes (Dunn *et al.*, 2006; Smyth *et al.*, 2006). Segundo Trobe *et al.* (2004), as terapias imunossupressoras pós-transplante também podem estar associadas à um aumento na incidência do câncer. Além disso, estudos com vacinas de CDs carregadas com antígenos tumorais *ex vivo* para indução de respostas imunológicas têm sido extensivamente realizados em modelos experimentais e em ensaios clínicos (revisado por Tacke *et al.*, 2007). Para isso, na maioria das vezes as CDs são isoladas do sangue periférico de animais ou pacientes na forma de monócitos, diferenciadas *in vitro* em CDs através de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony - stimulating factor*), manipuladas para incorporação dos antígenos tumorais específicos e novamente reintroduzidas por via intradérmica (Rolinski & Hus, 2010). Asada *et al.* (2006) demonstraram que camundongos que receberam o implante subcutâneo de células B16-F10 e foram tratados com vacina de CDs seguida da administração de LTs apresentaram uma maior resposta imune mediada por potentes LTC e NK contra os tumores pré-estabelecidos, quando comparados aos camundongos

tratados isoladamente com LTs ou CDs associadas aos antígenos de melanoma murino. Em humanos, Banchereau *et al.* (2001) demonstraram que aproximadamente 90% dos pacientes com melanoma no nível IV (*American Joint Comitee on Cancer*), tratados com vacinas de CDs carregadas com quatro tipos diferentes de antígenos (*Melan-A, MART-1, tyrosinase, MAGE 3 e gp 100*), tiveram um aumento da resposta imune contra o câncer, avaliada pela capacidade de LTs produzirem IFN γ . Neste mesmo estudo, houve uma queda na taxa de crescimento do tumor em alguns dos pacientes devido à resposta a mais de dois diferentes tipos de antígenos de melanoma. Rosenblatt *et al.* (2011) demonstraram resultados semelhantes em pacientes com mieloma múltiplo (MM) que também foram tratados com vacinas de CDs. Neste estudo, a vacinação resultou em expansão da circulação de LTs CD4⁺ e CD8⁺ e a maioria dos pacientes com MM avançado apresentaram estabilização da doença.

Os estudos descritos acima indicam que esta estratégia é segura e capaz de promover uma resposta imune antitumoral. Entretanto, apesar dos avanços, esta terapia apresenta limitações quanto à utilização em humanos, conservação dos antígenos apresentados via MHC, capacidade de migração das CDs aos linfonodos, custo, demanda de tempo para o desenvolvimento da vacina em laboratório, risco de contaminação durante a manipulação *in vitro*, incorporação de proteínas presentes no meio de cultura e restrição quanto aos subtipos de CDs que são obtidos em quantidade suficiente (revisado por Hamdy *et al.*, 2011). Devido a isto, estudos recentes têm sugerido a utilização de micro/nanopartículas de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis associadas às CDs, com intuito de se preservar os antígenos tumorais da degradação por enzimas proteolíticas, melhorar a eficácia na apresentação dos mesmos aos LTs e, conseqüentemente, promover uma potente resposta imune contra o câncer (Agarwal *et al.*, 2008; Bolhassani *et al.*, 2011; Kim & Mooney, 2011; Krishnamachari *et al.*, 2011). Hanlon *et al.* (2011) avaliaram a eficiência de CDs carregadas com antígenos tumorais provenientes do lisado de carcinoma de ovário com e sem associação de nanopartículas PLGA (*poly lactic-co-glycolic acid*) quanto à capacidade das

mesmas promoverem a expressão de moléculas co-estimulatórias em LTCD8⁺. Neste mesmo estudo, os LTCD8⁺ co-cultivados com CDs providas de PGLA apresentaram um maior número de moléculas co-estimulatórias associadas a sinais de ativação, típicos de uma resposta imune antitumoral. Em contraste, LTCD8⁺ co-cultivados com CDs carregadas somente com os antígenos tumorais apresentaram uma maior expressão de moléculas co-estimulatórias associadas a sinais inibitórios, exibindo um perfil característico de tolerância.

Portanto, o combate efetivo de neoplasias depende de um número adequado de células imunes com grande capacidade de reconhecimento de antígenos tumorais, migração, infiltração e ativação destas células no microambiente da neoplasia (Rosenberg *et al.*, 2004). Nesse sentido, o sistema imune pode contribuir para a eficácia clínica de outras modalidades de tratamento contra o câncer, tais como radioterapia e quimioterapia (Palucka *et al.*, 2011).

2.4. Mecanismos de evasão tumoral

Hanahan & Weinberg (2000) propuseram que células neoplásicas precisam adquirir seis características para que o tumor possa progredir: (a) crescer de forma autônoma, (b) evadir de mecanismos antiproliferativos e (c) de sinais pró-apoptóticos intrínsecos, (d) apresentar alto potencial proliferativo, (e) desenvolver capacidade de angiogênese e (f) crescimento invasivo e metastático. Posteriormente, Dunn *et al.* (2004) sugeriram a existência da sétima "marca do câncer": capacidade da célula maligna se evadir da atividade antitumoral do sistema imune.

A idéia de que o sistema imunológico tem um papel no controle do crescimento de tumores foi originalmente proposta por Paul Ehrlich em 1909, porém o estágio de desenvolvimento experimental da imunologia naquele período não permitiu a comprovação científica da hipótese (Torrezine & Athanaziou, 2008). Na década de 1950, Macfarlane Burnet e Lewis Thomas formalizaram a hipótese da imunovigilância, na qual o sistema imunológico estaria em um constante estágio de alerta para reconhecer o aparecimento de antígenos

tumorais (Dunn *et al.*, 2002). Entretanto, como mesmo em indivíduos imunocompetentes diversas neoplasias podem se desenvolver, o termo imunoeedição tem sido sugerido como uma extensão da hipótese da imunovigilância. Este indica que o sistema imunológico exerce uma pressão seletiva sobre os tumores, não somente os eliminando, mas também selecionando subclones menos imunogênicos e, desta forma, modelando o seu fenótipo durante o processo de progressão tumoral. A imunoeedição é caracterizada por três fases: a) recrutamento de células e moléculas pró-inflamatórias a partir do reconhecimento de antígenos tumorais, o que promove a eliminação de células neoplásicas susceptíveis a esses mecanismos, b) coexistência de células neoplásicas de baixa imunogenicidade que compõem o tumor com as células e moléculas imunológicas que controlam o crescimento das mesmas, numa fase de equilíbrio e, por fim, c) desenvolvimento de células neoplásicas em um ambiente anérgico, que propicia a progressão tumoral (fase de evasão) (Dunn *et al.*, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que a inflamação associada ao tumor não é sempre antitumoral, podendo também facilitar a progressão do câncer através da criação de tolerância imunológica local, uma condição modulada por fatores tumorais e do estroma (Muller *et al.*, 2008). Tolerância é a ausência de resposta do sistema imune adaptativo a antígenos, como resultado da inativação ou morte de linfócitos específicos, induzida pela exposição aos antígenos tumorais (Sotomayor *et al.*, 1996). Mais detalhadamente, o sistema imunológico pode ser ativado contra neoplasias malignas quando as células neoplásicas são drenadas até os linfonodos, através dos vasos linfáticos. Entretanto, o microambiente tumoral pode eventualmente apresentar características inibitórias, tais como: expressão reduzida de moléculas MHC I, resultando em perda de reconhecimento por LTCs, indução de apoptose de LTs via Fas-FasL, produção de citocinas inibitórias, como a interleucina-10 (IL-10), o fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), a prostaglandina E₂ (PGE₂) e, finalmente, recrutamento de células imunológicas supressoras, como os LTregs (revisado por Young, 2006). Assim, muitas vezes, ao invés de serem eliminadas pelo sistema imune, as células

neoplásicas conseguem proliferar nos linfonodos ou mesmo atingir outros órgãos por disseminação linfática, formando as metástases que representam a maior causa de morte relacionada ao câncer. Em muitas neoplasias malignas, como os carcinomas de mama, de boca, de colo de útero, de próstata, de pulmão e o melanoma, a principal via de metástase é a linfática, inicialmente para linfonodos regionais (Zhang *et al.*, 2010). A presença de células neoplásicas em linfonodos regionais é um fator importante para o estadiamento destes tumores e planejamento do tratamento cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico (Taipale *et al.*, 1999).

2.5. Melanoma

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define melanoma como uma neoplasia maligna originada a partir de melanócitos de pele ou mucosa (Barnes *et al.*, 2005; Le Boit *et al.*, 2006). Melanócitos são células que se originam de uma população germinativa de melanoblastos originários de células da crista neural, logo após o fechamento do tubo neural (revisado por Oliveira & Almeida, 2003). Posteriormente, os melanócitos migram do tronco da crista neural para a camada basal da epiderme, folículos pilosos, retina, ouvido interno, além das leptomeninges e mucosas (Erickson, 1993). Os melanócitos cutâneos estão associados a um efeito fotoprotetor contra radiação solar, uma vez que a melanina, produzida por estas células durante a melanogênese, atua como um filtro natural contra raios ultravioletas (UV) (Cario-André *et al.* 2000; Maddodi & Setaluri, 2008; Yu & Kim, 2010). Os raios UV são capazes de gerar estresse oxidativo e causar mutações nos melanócitos, que podem ganhar a capacidade de proliferar e invadir a derme, promover angiogênese e disseminar-se à distância, originando as metástases, principais determinantes da evolução clínica do melanoma (Miller & Mihn, 2006).

O melanoma cutâneo é um problema de saúde pública a nível mundial e sua incidência tem aumentado de forma marcante nos últimos anos (Erdei & Torres, 2010). Acredita-se que o aumento das taxas de incidência desta doença ocorra,

principalmente, pela alta exposição aos raios UV (Oikarinen & Raitio, 2000; Morton *et al.*, 2003; Tucker & Goldstein, 2003; Solomon *et al.*, 2004; Situm *et al.*, 2007; Moan *et al.*, 2008; Erdei & Torres, 2010; Autier *et al.*, 2011; Godar *et al.*, 2011; Kanavy & Gerstenblith, 2011). Nos Estados Unidos, a Academia Americana de Dermatologia (AAD) relatou que o melanoma foi o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres entre 20 a 29 anos de idade, com 68000 novos casos diagnosticados em 2010. Adicionalmente, os custos anuais em tratamento de neoplasias cutâneas não-melanoma nos EUA em 2007 foram estimados em 650 milhões de dólares, e, quando o melanoma foi incluído, o valor aumentou para 2,9 bilhões de dólares (Riker *et al.*, 2010). No Brasil, dados das *Estimativas de Incidência e Mortalidade do Instituto Nacional de Câncer (INCA)* previram para o ano de 2012, 3.170 casos novos em homens e 3060 em mulheres.

Além da radiação UV, outros fatores associados a esta neoplasia são história familiar, pele clara, nevos melanocíticos pré-existentes e mutações genéticas (Pho *et al.*, 2006; Waterhouse *et al.*, 2004; Gandini *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Alterações em genes supressores de tumor já foram associadas à progressão tumoral (Hussein, 2004). Dois genes de susceptibilidade para o melanoma foram identificados, o *CDKN2A (p16)*, no cromossomo 9p21 e o *CDK4*, no cromossomo 12. Mutações no *CDKN2A* são responsáveis por aproximadamente 20% dos casos de melanoma familiar (Tucker & Goldstein, 2003). Além disso, alguns polimorfismos em genes responsáveis pelo reparo do DNA, como *XRCC1* e *XPB*, do receptor de melanocortina 1 (*MC1R*), dentre outros, estão aparentemente associados ao aumento da incidência desta doença (Goode *et al.*, 2002).

Apesar de aproximadamente 90% dos casos desta neoplasia acometerem a pele, também podem ocorrer lesões em mucosa oral, esôfago, meninges e olhos (Femiano *et al.*, 2008; Guevara-Canales *et al.*, 2011; Spagnolo *et al.*, 2012; Kiecker *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2011). Melanomas que acometem a mucosa da região de cabeça e pescoço apresentam um comportamento biológico mais agressivo e seus possíveis marcadores prognósticos são menos conhecidos que no melanoma cutâneo (Kerr *et al.*, 2011). O melanoma primário de cavidade oral é

bastante raro, representando apenas 0,5% de todas as neoplasias malignas orais, e possui etiologia incerta (Meleti *et al.*, 2007). Nesta localização, os pacientes apresentam um pior prognóstico e, portanto, o diagnóstico precoce é fundamental (Auluck *et al.*, 2008).

A imunossupressão é potencialmente um fator de risco para o desenvolvimento de melanoma, uma vez que há estimativas de que pacientes após transplante tenham um risco cerca de 1,6 a 2,5 vezes maior de desenvolver melanomas do que a população em geral (revisado por Dinh & Chong, 2007). Entretanto, um amplo estudo realizado por Lindelöf *et al.* (2000), envolvendo 5000 pacientes que receberam transplantes de órgãos e que foram acompanhados durante cinco a seis anos, não confirma tais achados.

Os tratamentos empregados contra o melanoma são variados, podendo compreender cirúrgico, imunoterápico, quimioterápico regional ou sistêmico, bioquimioterápico (quimioterapia associada a imunoterapia) e radioterápico (Thompson *et al.*, 2005). A escolha do tratamento depende do estágio clínico em que o paciente com melanoma se encontra e da caracterização histológica desta neoplasia (Morton *et al.* 2003). Infelizmente, o melanoma apresenta grande potencial metastático, particularmente para linfonodos, pulmão e cérebro. Pacientes com doença avançada apresentam um prognóstico ruim e taxa de sobrevida de 5 anos abaixo de 20% (Sun *et al.*, 2001). Nestes casos, os tratamentos com radioterapia e quimioterápicos têm sido pouco eficientes (Kefford, 2005).

2.6. Resposta imune ao melanoma mediada por células dendríticas (CD)

As CDs representam populações heterogêneas, de acordo com a distribuição anatômica, fenótipo, modo de apresentação de antígenos e padrão de produção de citocinas (Ueno *et al.*, 2007). Dependendo do tipo de patógeno e da natureza do ambiente inflamatório, as CDs podem induzir perfis imunogênicos citotóxicos, humorais ou regulatórios (Banchereau *et al.*, 2000). Em camundongos, existem pelo menos dois principais subtipos de CDs: CDcs, que compreendem as

mielóides (CD11c⁺CD8 α ⁻CD11b⁺) e as linfóides (CD11c⁺CD8 α ⁺CD11b⁻), e CDs plasmocitóides (CDp) (CD11b⁻B220⁺) (Lanzavecchia & Sallusto, 2001; Naik *et al.*, 2007). Especificamente, as CDcs são responsáveis por mediar respostas imunes antitumorais através da indução de ativação de LTs para LTCs, enquanto as CDps são conhecidas como células produtoras de interferon (IFN) - I, mediador chave na resposta imune inata contra agentes virais, mas com pouca habilidade na estimulação de LTs virgens (Nierkens *et al.*, 2011). Como resultado de sua elevada expressão na maioria das CDcs (Metlay *et al.*, 1990; Brocker *et al.*, 1997), CD11c, uma integrina transmembrânica que também pode ser expressa em monócitos, macrófagos, neutrófilos, dentre outras células (Lancelin & Guerrero-Plata, 2011), é considerada um marcador típico para estas potentes APCs.

A principal função das CDs é promover a apresentação de antígenos aos LTs da imunidade adaptativa. Desta maneira, as CDs são essenciais no estabelecimento da complexa rede de interações entre as respostas imunes inata e adaptativa e representam ferramentas importantes para indução e manutenção da imunidade antitumoral (Kimura *et al.*, 2007).

Após ativação/maturação, CDs são capazes de providenciar três sinais imprescindíveis para ativação de LTs “virgens”. Mais especificamente, a interação entre CDs e antígenos de células tumorais em apoptose ou necrose leva à captura e processamento destes em pequenos peptídeos que são apresentados por moléculas MHC I e II, respectivamente, a LTCD8⁺ e LTCD4⁺ (sinal 1). A função das CDs é influenciada pelo seu estado de maturação. As CDs imaturas são capazes de capturar e processar antígenos, mas são incapazes de apresentá-los aos LTs ou de enviar sinais através de citocinas. À medida que elas entram em contato com diferentes citocinas, transformam-se em células maduras, que expressam moléculas acessórias capazes de interagir com outros receptores em LTs para aumentar a adesão e co-estimulação (sinal 2). Dentre essas moléculas, incluem-se: CD40 e CD80/CD86, as quais interagem, respectivamente, com o ligante de CD40 (CD40L) e CD28 nos LTs (Banchereau & Steinman, 1998). Após ativação, as CDs migram do tumor para o linfonodo sentinela (LNS). Neste,

LTCD4⁺ e LTCD8⁺ virgens são ativados através da interação com os peptídeos apresentados pelas CDs, que adicionalmente secretam grandes quantidades de IL-12, imprescindível para a ativação eficiente de LTs (sinal 3) (Kurts, 2000). Em seguida, LTCD4⁺ e LTCD8⁺ passam por uma expansão clonal, ganham funções efetoras distintas e encaminham-se para a região do tumor com o intuito de exterminar as células neoplásicas (Poindexter *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010).

Estima-se que uma única CD seja capaz de reconhecer cerca de quinhentos LTs diferentes em uma hora (Bouso & Robey, 2003). A presença de longas extensões denominadas “dendritos” aumenta a superfície de contato das CDs e as capacita a encontrar com múltiplos LTs simultaneamente (Winzler *et al.*, 1997). Os LTCD4⁺ auxiliares, através da produção de diferentes citocinas, ajudam na manutenção das respostas mediadas por LTCD8⁺ e outras células imunes citotóxicas inatas e adaptativas (Zitvogel *et al.*, 2006). As CDs também são responsáveis por modular as respostas de outras células do sistema imunológico, tais como células NK, LBs, entre outras (Larmonier *et al.*, 2010).

Na maioria dos casos, os LNS são os sítios primários mais comuns de metástases de melanoma (Fidler, 2001). Essa rota de disseminação é correlacionada com os aspectos clínicos (Taipale *et al.*, 1999), sugerindo que a invasão dos linfonodos é um passo importante para a disseminação do melanoma, resultando na supressão de sua função, com alterações tanto na atividade quanto na proporção de células imunológicas. Polak *et al.* (2005) constataram, através de estudos imunoistoquímicos, um reduzido número de CDs em linfonodos regionais metastáticos de melanoma, os quais, em sua maioria, não expressavam CD83 e CD40 e tinham poucos dendritos. Apesar disto, estas células expressaram altos níveis de HLA (*human leukocyte antigen*)-DR, indicando que tinham habilidade para apresentar antígenos, mas eram fenotipicamente imaturas para iniciar uma resposta imune antitumoral. Estes resultados sugerem que o tumor ou fatores associados a este podem estar relacionados com o processo de maturação e função das CDs. Em contrapartida, um recente estudo realizado por Baumgartner *et al.* (2011) demonstrou que a incubação de CDs mielóide derivadas (CDmd)

imaturas com meio condicionado proveniente de células de linhagem de melanoma metastático humano A375 não alterou os níveis de HLA-DR, CD83 e CD86 na superfície destas células. Além disso, no mesmo trabalho, a secreção de IL-10, IL-12 e de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), bem como a expressão da enzima IDO (*tryptophan-catabolizing enzyme indoleamine 2,3 - dioxygenase*), responsável pela supressão de LTs, não foi diferente das mesmas células incubadas com o meio controle. Estes resultados sugerem que fatores imunossupressores secretados pelo melanoma não alteram diretamente a maturação e função das CDmDs *in vitro*. Entretanto, este estudo tem como limitação o fato do meio condicionado não representar as condições encontradas pelas CDs intratumorais, as quais estão em contato direto com células neoplásicas, componentes do estroma e outras células imunológicas, tais como LTregs.

Estudos recentes têm sugerido que subconjuntos de CDs especializadas na apresentação e produção de citocinas regulam tanto LTCD8⁺ quanto LTregs. Ali, *et al.* (2009) demonstraram que a regulação e a ativação coordenada de subconjuntos de CDs, CDps e CDcs CD8⁺ em particular, através da injeção subcutânea do polímero sintético *polylactide-co-glycolide* (PLG) (biomaterial utilizado como veículo para a entrega de drogas, aprovado pela FDA), contendo componentes imunoestimulantes como GM-CSF, CPG-ODN (citosina-fosfatoguanosina oligodeoxinucleotídeo) ou lisado tumoral de células B16-F10, em camundongos previamente implantados com células B16-F10, aumentou drasticamente a imunidade destes animais contra o melanoma. A quantidade de CDps, CDcs CD8⁺, bem como a produção endógena de IL-12 foi fortemente correlacionada com a magnitude da imunidade antitumoral e geração de potentes LTCD8⁺ com inibição da atividade de LTregs, resultando em regressão completa dos tumores. Estes resultados indicam que um padrão de subconjuntos de CDs correlaciona-se com a evolução da terapêutica e respostas antitumorais, bem como sugerem que o PLG possa ser uma importante ferramenta para aplicação clínica na imunoterapia contra o câncer. Goldszmid *et al.* (2003) demonstraram

que células de melanoma B16 submetidas à morte por apoptose em cultura foram importantes fontes de antígenos para CDs utilizadas posteriormente como vacinas em camundongos, os quais apresentaram efetiva resposta antitumoral mediada por LTs CD8⁺ e CD4⁺.

Interações bidirecionais entre CDs e células NK envolvem tanto o contato célula-célula quanto a liberação de citocinas, como IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ (Semino *et al.*, 2005). Enquanto CDs ativam a proliferação de células NK, estas adquirem a habilidade de sustentar a maturação de CDs, que por sua vez podem induzir respostas mediadas por LTCD8⁺. Capobianco *et al.* (2008) demonstraram que a administração de CDs e células NK em melanomas e linfomas murinos é efetiva na redução do crescimento tumoral. Além disso, Lv *et al.* (2009) verificaram que a injeção intravenosa de CDs imaturas e células NK em camundongos portadores de melanoma com metástase pulmonar, além de inibir o crescimento tumoral e prolongar a sobrevivência dos animais, desenvolveu uma resposta imune de memória a longo prazo contra o tumor original, observada quando este era reimplantado.

Adicionalmente, no câncer, subtipos especiais de CDs podem ser gerados. Para exemplificar esta situação, CDs com atividades citotóxicas têm sido descritas nos últimos anos (Taieb *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2006; Chauvin *et al.*, 2008), caracterizadas pela co-expressão dos receptores B220 e NK1.1 e produção de grandes quantidades de IFN- γ , as quais são capazes de eliminar células neoplásicas e prevenir o crescimento tumoral. Devido a estas características, foram denominadas de CDs *killer* produtoras de IFN (CDKI) (Williams *et al.*, 2010). Jiang *et al.* (2008) demonstraram que a produção de IFN- γ pelas CDKIs pode ser induzida por *poly I:C*, um potente adjuvante na imunoterapia, resultando em regressão tumoral com inibição de metástases para fígado e pulmões em modelo de melanoma murino. Em contraste, foi demonstrado recentemente, a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, a existência de um outro subtipo de CDs, as CDregs, induzidas por fatores solúveis derivados de tumores. Estas estão correlacionadas com a supressão de respostas imunes antitumorais, uma vez que são capazes de

suprimir a proliferação de LTs previamente ativados, além serem diferentes tanto em função quanto no fenótipo, quando comparadas às suas precursoras CDcs ou CDcs imaturas (Shurin *et al.*, 2012). Portanto, a compreensão do comportamento biológico de CDregs, no contexto do microambiente tumoral é importante para que novas terapêuticas e abordagens sejam criadas para o controle da imunossupressão e tolerância associadas ao câncer.

2.7. Resposta imune ao melanoma mediada por linfócitos T CD8⁺ (LTCD8⁺)

No sistema imunológico, os principais participantes da resposta imune celular adaptativa são os LTs em geral, sendo os LTCD8⁺ atuantes contra células neoplásicas ou infectadas por microrganismos intracelulares como os vírus e bactérias (revisado por Medzhitov & Janeway, 2002; Fan & Zhang, 2005). Atualmente, sabe-se que a reação imunológica contra células de melanoma é mediada principalmente por LTCD8⁺, através do reconhecimento de antígenos específicos (Jager *et al.*, 1996). Esse conceito foi inicialmente fundamentado através do estudo da variabilidade de receptores de células T presentes em linfócitos infiltrados em melanomas humanos. Estes LTs, associados à IL-2, foram capazes de reconhecer os antígenos tumorais e levar à regressão destes tumores, o que fortemente sugeriu uma expansão clonal de células T ativadas. A identificação dos antígenos específicos de melanoma forneceu uma base sólida para o entendimento do papel da imunidade celular antígeno-específico na regressão desta neoplasia e para o desenvolvimento de vacinas imunológicas (revisado por Rosenberg, 2001).

O melanoma é notadamente um dos principais alvos da imunoterapia porque é capaz de suscitar uma resposta espontânea mediada por LTs (revisado por Boon *et al.*, 2006). Anichini *et al.* (1993) verificaram que a maioria desses LTs reconhecem antígenos de diferenciação compartilhados por melanócitos normais e células de melanoma. Esses antígenos são codificados por genes específicos de melanócitos tais como *TYR* (tirosinase), *MELAN-A* (Melan-A/Mart-1), *SILV* (pMel17/gp100), *TYRP1* (proteína derivada da tirosinase) ou *TYRP2*. LTs CD8⁺ e

CD4⁺ que reconheceram antígenos de diferenciação foram encontrados no sangue e entre os linfócitos que infiltraram os tumores (revisado por Boon *et al.*, 2006). Em um estudo realizado por Parmiani (2001), concluiu-se que MELAN-A é o antígeno mais fortemente reconhecido por células T dos pacientes *in vivo* e *in vitro*, quando comparado a gp100 e peptídeos derivados da tirosinase. Entretanto, nenhuma correlação foi encontrada entre a resposta de LTCD8⁺ a MELAN-A e a resposta clínica, quando este antígeno foi utilizado para vacinação.

LTs e células NK, quando ativados, apresentam mecanismos de lise tumoral mediados por duas proteases presentes em seus grânulos: granzima e perforina. Granzimas (Gr) constituem uma família de serina-proteases com diferentes membros em humanos e camundongos (revisado por Cullen *et al.*, 2010). Dentre eles, Grb tem sido extensivamente estudada devido às suas efetivas propriedades citotóxicas contra células neoplásicas. A eficiência da Grb se deve à habilidade desta protease provocar morte celular por apoptose através da ativação de caspases nas células-alvo (revisado por Rousalova & Krepela, 2010). Para isto, é necessário que a perforina (Prf) inicie a formação de poros nas membranas das células-alvo, permitindo a entrada de Gr. Este mecanismo ainda não foi completamente elucidado, mas Thiery *et al.* (2011) propuseram um modelo de duas etapas para a entrega de Gr, no qual a Prf primeiramente formaria poros transitórios na membrana citoplasmática da célula-alvo, permitindo um influxo de Ca⁺⁺ para o interior da mesma, a qual, em resposta, iniciaria um processo de reparo. Como consequência, Gr e Prf seriam endocitadas para o interior de endossomos gigantes (denominados gigantossomos). Em seguida, novamente pela ação da Prf, haveria a formação de poros maiores e mais estáveis na membrana endossomal, permitindo a liberação de Gr para o interior do citoplasma da célula-alvo. Devido ao seu papel relevante, animais *knockout* para perforina apresentam maior susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores espontâneos e induzidos (Kägi *et al.*, 1994; van den Broek *et al.*, 1996; Street *et al.*, 2004). Adicionalmente, van Houdt *et al.* (2009) demonstraram, através de estudos imunistoquímicos, que a presença de LTs intratumorais Grb⁺ em

melanomas primários não possui valor preditivo em relação ao estado do LNS, entretanto, a ausência destas células imunes ativadas apresentou uma forte associação com a presença de metástases nos LNS, por meio de comparação de amostras de melanoma provenientes de 40 pacientes com (n=20) e sem (n=20) metástases em LNS. Ainda, Gassara *et al.* (2006), monitorando *in vitro* a degranulação de Gr e Prf presentes em linhagem celular humana de LTs citotóxicos (LTC) (clone LT12) em co-cultura com linhagens celulares autólogas derivadas do melanoma primário e de sua respectiva metástase para LN, demonstraram que células de melanoma em tumores primários apresentavam maiores taxas de apoptose, quando comparadas às células metastáticas presentes nos LN. Além disso, constataram que LTCs, na presença das células do tumor primário, apresentaram maior expressão de RNAs mensageiros para Gr e Prf, além de um maior influxo de Ca^{++} , indicando maior atividade metabólica, do que quando na presença das células metastáticas. Esses resultados sugeriram que LTCs co-cultivados com células provenientes da metástase são potencialmente menos ativos e, conseqüentemente, menos eficazes na eliminação de células neoplásicas metastáticas, entretanto, a capacidade de degranulação foi semelhante frente às células do tumor primário e da metástase.

Respostas imunes antitumorais, espontâneas ou estimuladas por imunoterapia, geralmente não levam à erradicação do melanoma, mesmo quando há sucesso no recrutamento de LTs ao local do tumor. Isso pode ser explicado por múltiplos mecanismos de inibição dos LTs ou da expressão de antígenos tumorais. Alguns destes mecanismos podem ser inibidos por células imunossupressoras tais como LTregs, CDregs ou MDSCs (Zou *et al.*, 2006; Filipazzi *et al.*, 2006). Ainda, a expressão da enzima IDO em tumores metastáticos de melanoma reduz a quantidade de triptofano, catalizando a conversão deste aminoácido importante para homeostase de LTs em metabólitos imunossupressivos que promovem o desenvolvimento e ativação de LTregs e suprimem a função de células efetoras (Fallarino *et al.*, 2003; Uyttenhove *et al.*, 2003; Brenk *et al.*, 2009). Outro mecanismo supressor é representado pela

associação da molécula de superfície PD-1 (*programmed death receptor-1*) nas células T com o seu ligante PD-L1 expresso nas células tumorais. Essa interação inibe a proliferação dos LTs e a capacidade destes produzirem IFN- γ e IL-10 (Blank *et al.*, 2007). É sabido que células de melanoma podem expressar tanto PDL-1 quanto IDO em resposta à IFN- γ , uma citocina produzida por LTs ativados e células NK, assim, as próprias células de melanoma também podem alterar a eficácia das respostas antitumorais (Kholmanskikh *et al.*, 2010).

A combinação de vacinas imunológicas e medicamentos que suscitam uma resposta imunológica pode ser uma alternativa para se contrapor aos mecanismos imunossupressores e pró-tumorais. Frederiksen *et al.* (2008) estudaram o envolvimento da administração intravenosa de IL-21 em 72 pacientes com melanoma metastático e concluíram que a IL-21 foi capaz de aumentar a atividade antitumoral através da expansão, motilidade e funções efetoras de LTCD8⁺ e células NK. Adicionalmente, o tratamento de pacientes com IL-21 também foi capaz de elevar os níveis de RNAs mensageiros de moléculas co-estimulatórias da resposta imune, bem como de Gr e Prf. van der Most *et al.* (2009) utilizaram um modelo de camundongo com mesotelioma, AB1-HA, com intuito de investigar se a resolução tumoral seria dependente de LTs após a quimioterapia com ciclofosfamida. Através deste estudo, observou-se que os tumores AB1-HA estabelecidos foram curados com uma única dose desse medicamento. Ademais, os efeitos foram atribuídos não à presença de LTCD8⁺ e células NK, mas sim à capacidade destas células causarem a morte de células neoplásicas por apoptose, através da produção de moléculas efetoras importantes, como IFN- γ e TRAIL (*tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand*). Com base nesses dados, demonstrou-se que a ciclofosfamida foi capaz de sensibilizar as células neoplásicas para a ação de LTCD8⁺ e células NK, uma vez que respostas efetivas não foram observadas em camundongos atímicos.

2.8. Resposta imune ao melanoma mediada por células *Natural killer* (NK)

Células NK são linfócitos derivados da medula óssea, caracterizados pela sua potente capacidade citolítica contra células neoplásicas ou infectadas por vírus, sem prévia estimulação antigênica (revisado por Cerwenka & Lanier, 2001; Yokoyama & Plougastel, 2003; Arnon *et al.*, 2006; Moretta *et al.*, 2006; Brandstadter *et al.*, 2011). Fenotipicamente, estas células são caracterizadas por serem CD3⁻CD56⁺, em humanos, e CD3⁻NK1.1⁺ ou CD3⁻CD49b⁺, em camundongos (Arase *et al.*, 2001; Yokoyama & Plougastel, 2003). Em humanos, as células NK compreendem de 5 a 20% dos leucócitos sanguíneos periféricos, 2 a 7% dos linfócitos presentes em linfonodos, 3 a 10% dos linfócitos presentes no baço, podendo também infiltrar o estroma de tumores sólidos, nos quais representam 8 a 10% dos linfócitos infiltrados em tumores (TIL) (revisado por Vujanovic, 2005). O termo regressão, utilizado na caracterização de tumores, consiste em evidências microscópicas de infiltrado linfocítico entre as células neoplásicas, as quais vão sendo separadas em pequenos grupos, acompanhado de proliferação de fibroblastos e neovascularização. Em seguida, o componente inflamatório diminui e as células do tumor tornam-se esparsas ou desaparecem completamente. Quando a regressão total ocorre em melanomas, observa-se pigmentos residuais de melanina dispersos no interior de uma área de fibrose (revisado por Menzies *et al.*, 1997). Entretanto, a regressão total espontânea de melanomas cutâneos ocorre somente em torno de 0,2% dos casos (revisado por King *et al.*, 2001). Recentemente, McKay *et al.* (2011) avaliaram a relação entre o número de linfócitos CD56⁺ e CD8⁺ e a regressão parcial de melanomas (n=21), através de análises histológicas e imunoistoquímicas. Apesar de a maior parte dos linfócitos serem positivos para CD8, somente as células NK CD56⁺ apresentaram um número significativamente maior em melanomas com regressão, quando comparados com o controle (melanomas sem regressão). Além disso, as células NK CD56⁺ foram mais abundantes em áreas de regressão inicial e foram escassas em áreas de regressão tardia. A partir destes resultados, concluiu-se que as células NK possam estar envolvidas na patogênese desta neoplasia e apresentar

um papel relevante na regressão destas lesões, tanto como células citotóxicas efetoras, quanto como mediadoras de mecanismos citotóxicos.

A destruição de células tumorais pelas células NK pode ocorrer por mecanismos imunomodulatórios dependentes da produção de citocinas tais como IFN- γ e TNF- α , ou diretamente, através da degranulação de Gr e Prf, que respectivamente, promovem apoptose e lise celular (revisado por Lanier, 2005; Farag *et al.*, 2006). Hoover *et al.* (2009) demonstraram que camundongos deficientes de moléculas associadas à função citolítica das células NK, quando comparados aos animais do grupo controle, apresentaram capacidade reduzida em conter metástases pulmonares após injeção endovenosa de células de melanoma B16 pela veia caudal.

Devido aos importantes papéis desempenhados por CDs, LTs e NKs, diversos pesquisadores têm explorado a interação entre estas células na resposta imune contra o câncer (Boczkowski *et al.*, 1996; Heiser *et al.*, 2002; Gerosa *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2011; Soudja *et al.*, 2011). Kim *et al.* (2001) demonstraram que camundongos imunizados com CDs previamente co-cultivadas com células de carcinoma de cólon CT-26 apresentaram uma maior atividade de LTCs e de células NK contra o tumor. Entretanto, a imunização com as CDs associada à depleção *in vivo* de células NK resultou em uma marcada redução da atividade de LTCs específicos contra células neoplásicas. Estes resultados sugerem que a ativação de LTCs com propriedades antitumorais através de CDs é dependente da atividade de células NK. Xu *et al.* (2004) descreveram que camundongos inoculados com células de melanoma B16-F10, tratados concomitantemente com IL-12 e com um anticorpo de ação agonista sobre o receptor 4-1BB, o qual é expresso em LTs, células NK ativadas e CDs, apresentaram regressão sinérgica do tumor primário estabelecido e das metástases pulmonares através da ação de células NK e LTCD8⁺. Além disto, outros estudos (Welte *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008) têm demonstrado que a função das células NK também pode ser modificada por várias outras citocinas ou enzimas, incluindo IL-15, -18, -21, -23, TGF- β ouIDO, bem como por pCDs, monócitos e células tronco mesenquimais.

Em experimentos de co-cultura, fibroblastos isolados a partir de melanomas metastáticos foram capazes de interferir na função citotóxica e de liberação de citocinas pelas células NK através da secreção de PGE₂ (Balsamo *et al.*, 2009). Esses achados mostram que respostas efetivas das células NK contra células neoplásicas podem diferir substancialmente como consequência da interação entre células NK e os diferentes tipos celulares em diferentes locais onde os tumores estão presentes. Nesse contexto, torna-se evidente que tumores podem influenciar a natureza e a eficácia das respostas imunes do hospedeiro, por exemplo, pelo recrutamento de LTregs ou de MDSCs e/ou pela produção de vários fatores imunossupressores comoIDO e TGF- β (Zitvogel *et al.*, 2006).

As células NK apresentam receptores de ativação e inibição que determinam sua capacidade de ativação. A ligação de receptores ativadores da superfície das células NK com os respectivos ligantes nas células-alvo desencadeia a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a exocitose dos grânulos contendo Gr e Prf, sendo diretamente correlacionada com a eliminação de células neoplásicas. Os receptores ativadores expressos tanto em camundongos quanto em humanos incluem CD16, NKG2D, DNAM-1, NCRs (*Natural Cytotoxicity Receptors* - NKp46, NKp30 e NKp44), dentre outros (revisado por Vivier *et al.*, 2008). Nos melanomas, as interações moleculares específicas envolvidas ainda não foram determinadas. Em um estudo realizado com pacientes que apresentavam melanomas metastáticos, a expressão reduzida de NKG2D por células NK foi correlacionada com uma menor citotoxicidade e capacidade de produção de IFN- γ , sugerindo que esta molécula é importante para a resposta imune contra este tipo de neoplasia (Konjevic *et al.*, 2009). Adicionalmente, Lakshmikanth *et al.* (2009) demonstraram que células de melanoma provenientes de tumores murinos e humanos apresentavam ligantes para os receptores NCRs e DNAM-1 de células NK. Neste mesmo estudo, também constataram que o bloqueio destas moléculas com anticorpos neutralizantes ou através de *knockout* gênico reduziu a capacidade das células NK de reconhecerem e eliminarem células de melanoma *in vivo* e *in vitro*.

Estes resultados sugerem que células NK que expressam DNAM-I e NCRs podem ser mediadores importantes na resposta imune inata contra o melanoma.

Em contrapartida, os receptores de inibição reconhecem moléculas MHC I próprias, expressas na superfície de todas as células nucleadas, prevenindo a ativação das células NK e, conseqüentemente, a lise de células normais do hospedeiro. Células que apresentam a expressão reduzida de proteínas MHC I, devido à infecção por vírus ou transformação maligna, não conseguem, efetivamente, gerar sinais inibitórios, tornando-se vulneráveis à ação das NK. Desta forma, ao contrário dos LTs, as células NK podem representar uma linha de defesa inicial contra células neoplásicas nos tumores primários e nos sítios metastáticos, previamente à resposta adaptativa (revisado por Yokohama *et al.*, 2004). A transferência autóloga de LTs reativos derivados de TILs expandidos *in vitro* para pacientes com melanoma metastático pode mediar a regressão tumoral, entretanto, este tipo de terapia pode falhar em alguns casos devido à baixa capacidade de expansão de LTs e à baixa expressão de MHC I pelas células neoplásicas (revisado por Rosenberg & Dudley, 2009; Turcotte & Rosenberg, 2011). Parkhurst *et al.* (2011) realizaram um ensaio clínico para se avaliar a eficácia de transferência de células NK autólogas, com alta capacidade citolítica *in vitro*, no tratamento de pacientes com melanoma metastático. Infelizmente, nenhuma resposta clínica foi observada e apesar das células NK transferidas terem persistido na circulação periférica dos pacientes por pelo menos uma semana, apresentaram baixos níveis do receptor ativador NKG2D. Esses resultados sugerem que várias estratégias auxiliares são necessárias para a melhoria da atividade das células NK, como a administração de bloqueadores de sinais inibitórios, manipulação genética para um aumento na expressão de receptores ativadores, administração de drogas que promovam expansão e ativação destas células, dentre outras (Terme *et al.*, 2008). Em células NK, existem duas famílias estruturalmente distintas de receptores inibitórios para MHC I: receptores de lectina tipo C (Ly49, CD94/NKG2) e receptores semelhantes à imunoglobulina das células NK (KIR). Células NK humanas expressam os

receptores KIR, cujos correspondentes homólogos em camundongos são denominados Ly49, e ambas espécies expressam CD94/NKG2 (revisado por Dimasi *et al.*, 2004). Em camundongos C57/Bl6, foram identificados pelo menos 23 receptores Ly49 (A-W) inibidores ou ativadores (McQueen *et al.*, 1998; Wilhelm *et al.*, 2002; Makrigiannis *et al.*, 2002; Yokohama *et al.*, 2003), sendo Ly49A o protótipo de receptor inibidor da ação citolítica de células NK, expresso em aproximadamente 20% das células NK de camundongos C57/Bl6 (Orihuela *et al.*, 1996; Ortaldo *et al.*, 1999; revisado por Yokoyama & Plougastel, 2003). Os receptores Ly49A reconhecem os epítomos H-2Dd, H-2Dk e H-2Dp em moléculas MHC I das células-alvo e esta ligação gera sinais que previnem a eliminação destas últimas (Correa & Raulet, 1995). Portanto, um possível mecanismo de evasão tumoral à ação de células NK consiste na expressão de ligantes MHC I que se associam aos receptores inibitórios presentes nas células NK. De fato, Karlhofer *et al.* (1992) demonstraram, através de experimentos *in vitro*, que células NK Ly49⁺ ativadas por IL-2, derivadas de camundongos C57/Bl6, não eram capazes de promover lise das células-alvo transfectadas com o ligante H-2Dd. Entretanto, com a utilização de anticorpos monoclonais direcionados contra Ly49 ou aos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do H-2Dd, esta resistência foi anulada, indicando que as células NK possuem receptores inibitórios que reconhecem antígenos MHC I específicos. Posteriormente, Koh *et al.* (2001) demonstraram *in vivo* que a utilização de fragmentos F(ab')(2) do anticorpo monoclonal 5E6 contra os receptores inibidores de células NK murinos Ly49C e Ly49I também foi eficaz no aumento da sobrevivência de animais, em modelo experimental de leucemia murina (C1498 / C57/Bl6). Adicionalmente, Tahima *et al.* (2004) demonstraram que a utilização de substâncias bloqueadoras (*phage display peptide*) específicas contra os receptores inibidores Ly49A, presentes na superfície das células NK de camundongos, aumentou a ação lítica destas células sobre as linhagens tumorais murinas C1498 (leucemia mielóide) e A20 (linfoma de células B) que possuíam o epítomo H-2Dd em seus MHC I. Estes autores concluíram que a utilização destas substâncias aumenta a efetividade antitumoral mediada por células NK, através do

bloqueio de receptores inibitórios, consistindo em uma possível estratégia de imunoterapia contra o câncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar os efeitos da inibição da atividade de FASN com Orlistat sobre as células imunológicas presentes nos tumores primários e metástases de camundongos C57/Bl6 inoculados com células B16-F10.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Confirmar os efeitos do tratamento com Orlistat sobre o número de metástases espontâneas provocadas pela injeção intraperitoneal de células B16-F10 em camundongos C57/Bl6.

3.2.2. Comparar o efeito do tratamento com Orlistat sobre as porcentagens dos subtipos LT CD3⁺CD8⁺, NK CD3⁻CD49b⁺ e CD CD11c⁺ presentes nos tumores primários e linfonodos mediastínicos metastáticos nos grupos tratado e controle.

3.2.3. Avaliar o efeito do tratamento com Orlistat sobre o estado de ativação dos subtipos celulares identificados nos tumores primários e respectivos linfonodos metastáticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

A linhagem B16-F10 (ATCC), derivada de melanoma de camundongo, 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, Brasil) e soluções antibiótica e antimicótica (Invitrogen), na diluição de 1:100, a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

As células foram subcultivadas quando atingiam uma confluência de 60 a 70% (aproximadamente 48 h). Para isto, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e então incubadas a 37°C com 1 ml de tripsina a 2%. Após um período 2 min, as células ficavam separadas do assoalho do frasco de cultura (determinado por observação em microscópio de contraste de fase), sendo então a ação da tripsina interrompida pela adição de 10 ml de meio de cultura contendo 10% de FBS. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning Costar, New York, NY, E.U.A.) e estes centrifugados a 800 *xg* por 3 min. O sobrenadante era removido e descartado e os *pellets* de células ressuspensos em 5 ml de meio de cultura com 10% de FBS, as células contadas e re-plaqueadas em novos frascos de cultura. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h. Visando manter o estoque congelado em nitrogênio líquido e trabalhar sempre com as células em passagens semelhantes, congelamos várias amostras desta linhagem celular antes da realização dos experimentos. Para isto, 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 descongelar as células, os criotubos (NUNC) foram colocados em banho de água a 37°C e, após rápido descongelamento, as células foram transferidas para tubos de 15 ml contendo 10 ml de meio suplementado e centrifugadas. Os *pellets* foram então ressuspensos em 10 ml de meio de cultura

e as células plaqueadas para realização dos experimentos. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as células B16-F10 subcultivadas no máximo por dez passagens e então descartadas.

4.2. Preparo das soluções de Orlistat

Para a aplicação nos camundongos utilizados nos experimentos deste trabalho, 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 a 33% em PBS, 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. Modelo animal de metástases espontâneas de melanoma

O modelo animal utilizado foi inicialmente descrito pelo professor Sílvio S. Veiga (Departamento de Biologia Celular, UFPR) em sua tese de doutorado (Veiga, 1997). Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (n° 2150-1, CEEA-IB-UNICAMP, **anexo I**).

Cento e oitenta camundongos da linhagem C57/Bl6, machos, com 6 semanas de vida, foram obtidos junto ao CEUA-UNICAMP, mantidos em gaiolas apropriadas, alimentados com ração comercial Labina[®] (Purina, Brasil) e providos de água *ad libitum*. As gaiolas ficaram em sala climatizada, com controle automático de iluminação, alternando períodos claros e escuros a cada 12 h. Em cada experimento, foram realizados implantes intraperitoneais de células B16-F10 ($2,5 \times 10^5$) suspensas em 200 µl de PBS. Quarenta e oito horas após as inoculações, iniciou-se o tratamento diário com 60 µl da solução de Orlistat (o que corresponde a 240 mg/kg/dia – via i.p.) até o 12° dia (Kridel *et al.*, 2004). Os animais dos grupos controle receberam injeções somente com o veículo (60 µl de uma solução contendo 33% etanol em PBS).

No 14º dia após os implantes das células, todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e imediatamente dissecados, sendo coletados os tumores primários intraperitoneais e os linfonodos mediastínicos metastáticos (facilmente identificados por sua coloração negra) para imunofenotipagem e avaliação da expressão gênica (**Figura 3**).

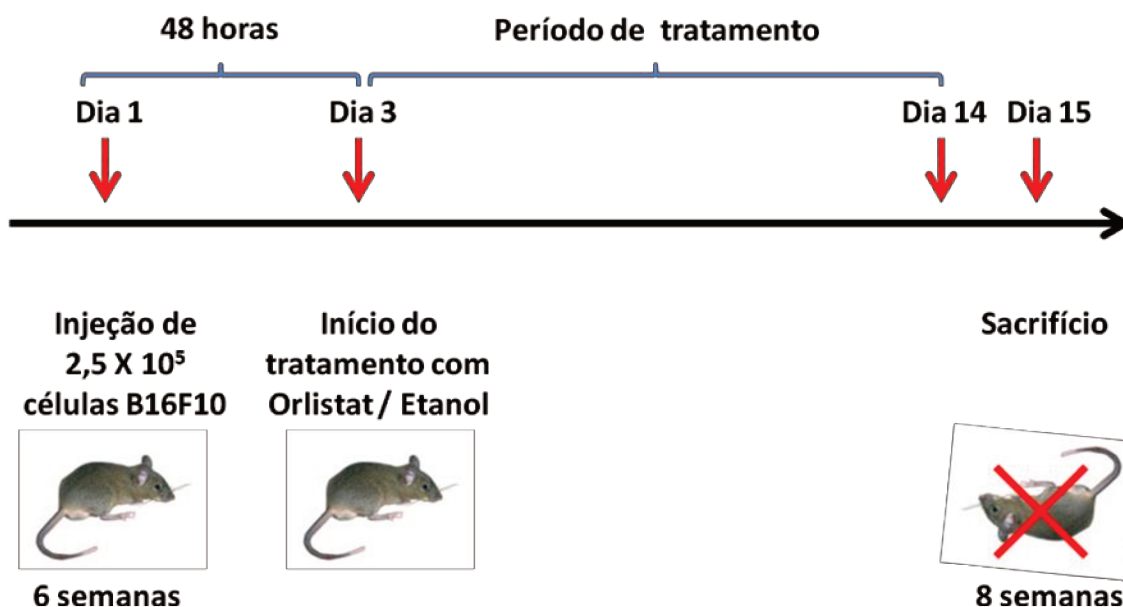


Figura 3: Desenho experimental do modelo de melanoma murino e tratamento com Orlistat.

4.4. Isolamento de células dos tecidos tumorais primário e metastático

Os linfonodos metastáticos de 10 animais de cada grupo experimental (2 experimentos) foram misturados, para que fosse possível obter número suficiente de células para as análises posteriores. O isolamento das células presentes no *pool* de linfonodos mediastínicos foi realizado a partir de modificações do protocolo já descrito por Vremec (2010). Brevemente, os linfonodos foram lavados com PBS estéril e colocados sobre uma placa de Petri contendo meio RPMI com 10% de FBS sobre gelo picado e, em seguida, dissecados para separação da cápsula fibrosa e da gordura que os revestem. Os linfonodos dissecados foram então dispostos em um microtubo de 1,5 ml contendo RPMI 10% FBS e

macerados manualmente com auxílio de um homogeneizador de tecidos (*pellet pestle*) (Sigma) sobre o gelo, para separação inicial das células do órgão. Em seguida, os linfonodos fragmentados foram transferidos para um tubo plástico cônico com capacidade para 15 ml (Corning) contendo 1 ml de solução de colagenase D (0,25%) (Roche, Indianapolis, IN, E.U.A.) em PBS. As amostras foram incubadas a 37°C em banho de água durante 30 min. Após a incubação, o material foi ressuspensão em 10 ml de PBS e o *pellet* de células foi obtido após centrifugação a 283 *xg*, a temperatura de 4°C por 10 min.

Os tumores primários foram removidos e dispostos sobre placas de Petri de 60 mm de diâmetro contendo 5 ml de solução de PBS e macerados com auxílio de pinças de ponta romba. A solução de colagenase D não foi necessária devido à natureza friável do tecido, que facilitou a separação das células.

Em seguida, o material proveniente dos tumores primários e dos linfonodos foi ressuspensão, respectivamente, em 30 e 15 ml de PBS e filtrado com auxílio de filtro estéril de 70 µm de porosidade (BD Falcon *cell-strainer*) (Becton Dickinson Biosciences, E.U.A.) acoplado a um tubo plástico cônico com capacidade para 50 ml (Corning). Os *pellets* de células foram obtidos após centrifugação a 283 *xg*, a 4°C por 10 min. Neste momento, tanto aos *pellets* de células dos linfonodos quanto aos tumores primários, adicionou-se, 1 e 5 ml de EDTA 0,1M (pH 7,5), respectivamente. Após ressuspensão, as células foram mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente com intuito de se separar os complexos células dendríticas-linfócitos. Após este procedimento, adicionou-se PBS até se completar 15 ml para as células dos linfonodos e 30 ml para as células dos tumores primários. Após centrifugação, os *pellets* resultantes dos linfonodos e dos tumores primários foram ressuspensão, respectivamente, em 1 e 5 ml de tampão de lise de hemácias (0,16 M de NH₄CL e 0,17 M de NH₄CO₃, pH 7,65; na proporção 1:1) e mantidos por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, completou-se com PBS para 15 e 30 ml os tubos contendo os *pools* de linfonodos e os tumores primários, respectivamente, e as amostras foram novamente centrifugadas a 283 *xg*, 4°C,

durante 10 min. Finalmente, o sobrenadante foi removido e descartado e os *pellets* de células ressuspensos em 10 ml de PBS.

Vinte microlitros das suspensões celulares foram usados para contagem em hemocítmetro, com o objetivo de distribuir entre 10^6 a 10^7 células em cada tubo de citometria de fluxo (BD Falcon™) (BD Biosciences).

4.5. Imunofenotipagem de células obtidas de linfonodos mediastínicos e de tumores primários intraperitoneais

Para se estudar as células imunológicas presentes nos tumores primários intraperitoneais e nas metástases linfonodais dos camundongos tratados ou não com Orlistat, foram realizadas imunofenotipagens pela técnica de imunofluorescência por meio de citometria de fluxo.

As células obtidas dos tumores primários ou de suas metástases foram incubadas por 40 min a 4°C com anticorpo monoclonal não conjugados anti-FcR (receptor Fc) murino (clone 2.4G2, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. João Santana da Silva, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP), a fim de se evitar subseqüentes ligações inespecíficas entre os anticorpos monoclonais conjugados e os receptores Fc das células imunes intratumorais. Após esse período, foram adicionados anticorpos monoclonais específicos, os quais foram incubados por 40 min a 4°C (**Tabela 2**). Para a caracterização imunofenotípica de LTCD8⁺, foram utilizados os anticorpos anti-CD3 e CD8. CDs foram identificadas a partir do anticorpo anti-CD11c e de seus marcadores de ativação, anti-MHC I, CD80 e CD86. Quanto às células NK, a identificação foi realizada pela presença do marcador anti-CD49b, além de seu receptor inibitório Ly49A, em células CD3 negativas. Os controles isotípicos foram utilizados para detectar fluorescências inespecíficas (células negativas) e, desta forma, definir as regiões fluorescentes (células positivas).

Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS, centrifugadas por 10 min a 283 xg e ressuspensas em 500 µl de formaldeído a 1% em PBS. A seguir, em um citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio (BD

Biosciences), foram adquiridos 25.000 e 50.000 eventos por amostra dos *pools* de linfonodos e dos tumores primários, respectivamente. As análises foram realizadas através do *software* Cell Quest Pro[®] (BD Biosciences), conforme plataforma gráfica ilustrada nas **Figuras 4, 5, 6 e 7**. A partir do gráfico de morfologia FSC X SSC (*Foward Scatter* - tamanho - *versus Side Scatter* - granulosidade), regiões (R) foram inicialmente delimitadas por um *gate* específico de acordo com as subpopulações de interesse e, posteriormente, distinguidas a partir de seus respectivos fluorocromos conjugados aos anticorpos específicos.

Tabela 2: Anticorpos utilizados para as imunofenotipagens através de citometria de fluxo

Anticorpo	Clone	Marca	Marcação	Combinações
Isotype IgG2b, κ-APC	27-35	BD Biosciences	Marcação não específica	Isotype IgG2a, κ-PE/ Isotype IgG ₁ -PerCP/ Isotype IgG2a, κ-FITC
Isotype IgG2a, κ-PE	G155-178	BD Biosciences	Marcação não específica	Isotype IgG2b, κ-APC /Isotype IgG ₁ -PerCP/ Isotype IgG2a, κ-FITC
Isotype IgG ₁ -PerCP	11711	R&D Systems	Marcação não específica	Isotype IgG2b, κ-APC/ Isotype IgG2a, κ-PE/ Isotype IgG2a, κ-FITC
Isotype IgG2a, κ-FITC	eBM2a	eBioscience	Marcação não específica	Isotype IgG2b, κ-APC/ Isotype IgG2a, κ-PE/ Isotype IgG ₁ -PerCP
Anti CD3e-FITC	145-2C11	BD Biosciences	Linfócitos T CD8	Anti CD8b-PE
Anti CD8b-PE	H35-17.2	BD Biosciences	Linfócitos T CD8	Anti CD3-PerCP
Anti CD49b-APC (pan-NK cells)	HMA2	BD Biosciences	Células <i>Natural Killer</i>	Anti CD3-PerCP
Anti Ly49a-PE	A1	BD Biosciences	Células <i>Natural Killer</i>	Anti CD49b-APC (pan-NK cells)/ Anti CD3-PerCP
Anti CD11c-PE	HL3	BD Biosciences	Células Dendríticas	-----
Anti CD80-APC	16-10A1	BD Biosciences	Ativação de Células Dendríticas	Anti CD11c-PE
Anti CD86-PerCP	GL-1	BioLegend	Ativação de Células Dendríticas	Anti CD11c-PE
Anti MHC I-FITC (H-2Db)	28-14-8	eBioscience	Ativação de Células Dendríticas	Anti CD11c-PE

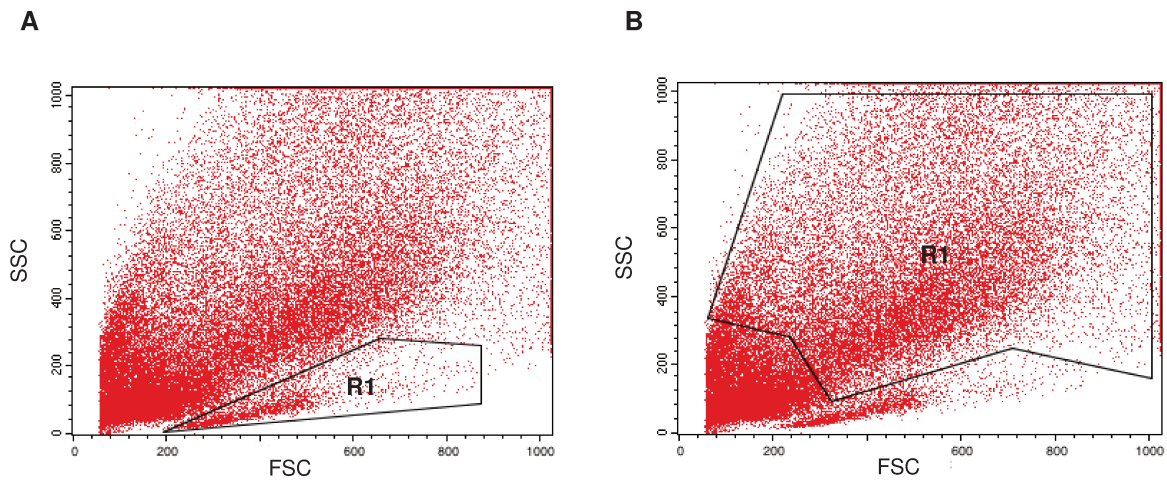


Figura 4: Imagens representativas da análise imunofenotípica demonstrando a estratégia de *gates* a partir do gráfico inicial de morfologia FSC X SSC, de acordo com a subpopulação de interesse. **R1** em **A** é o local mais provável de localização de linfócitos, tanto de LTCD8⁺ como de NK, com tamanho e complexidade menores. Em **B**, a região de abrangência das CDs é delimitada por um extenso *gate* (**R1**), que exclui apenas a região de linfócitos e de debris celulares, uma vez que estas células apresentam morfologias variadas.

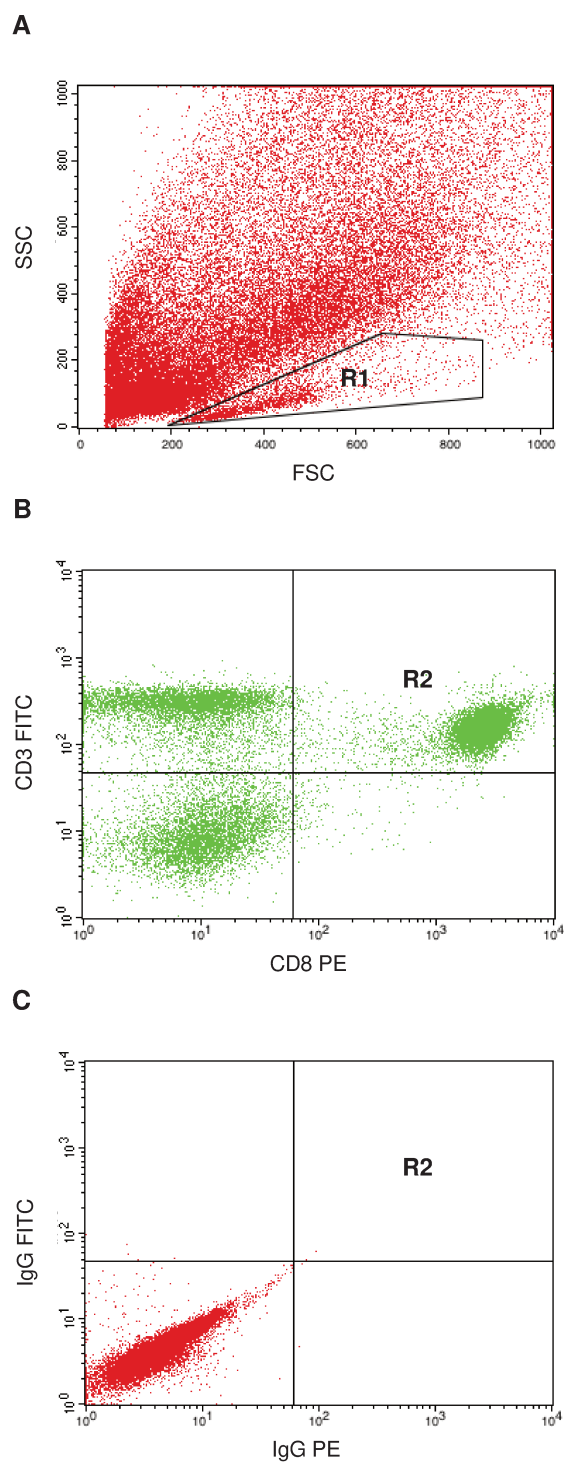


Figura 5: Imagens representativas da análise imunofenotípica a partir de **R1** no gráfico inicial de morfologia FSC X SSC (**A**), para a detecção de linfócitos duplo-positivos para CD3 e CD8 (LTCD8⁺) em **R2** (**B**). Os isotipos controles IgG PE e FITC (**C**) foram utilizados para estabelecer o limite entre as regiões de fluorescência negativa e positiva.

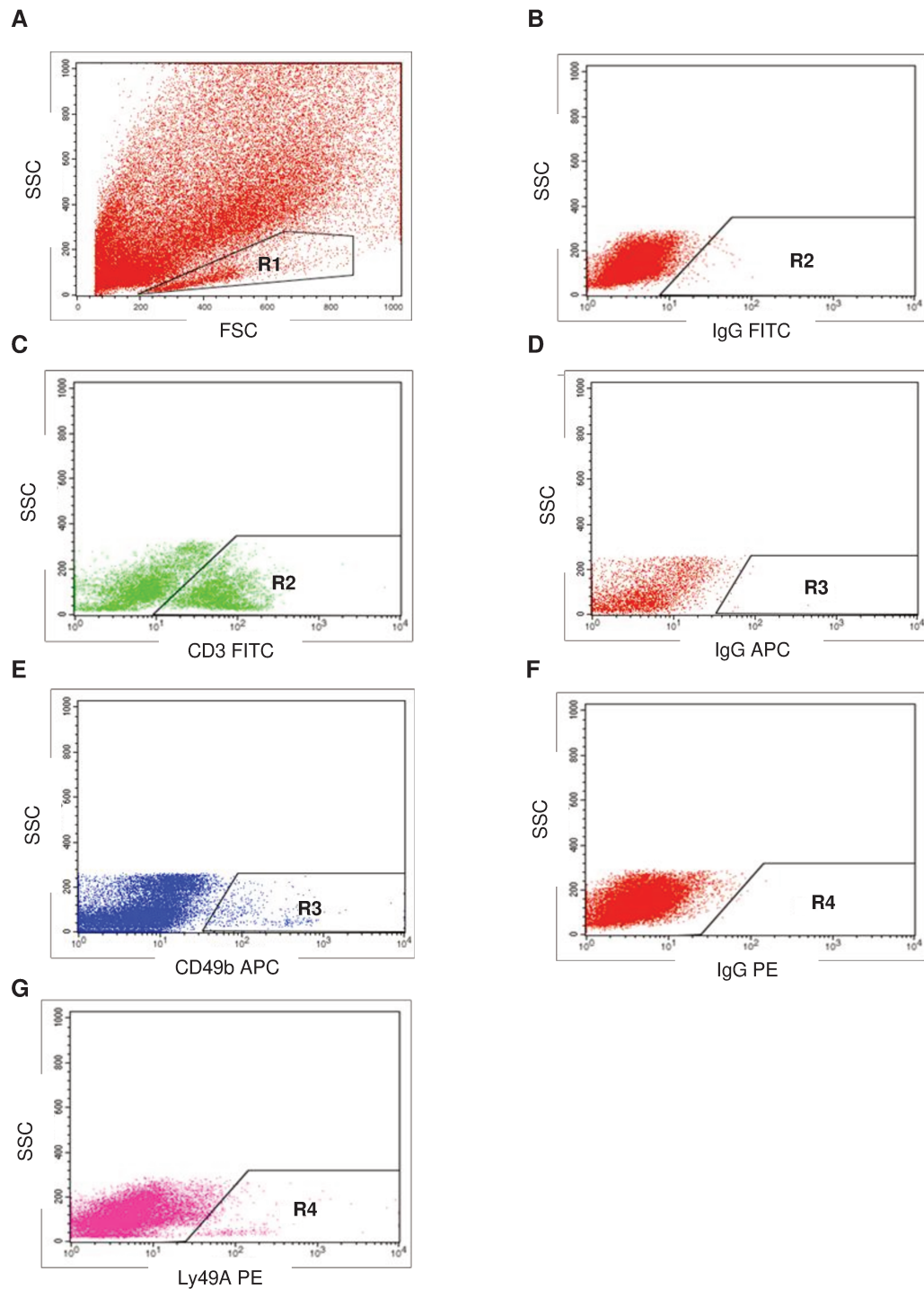


Figura 6: Imagens representativas da análise imunofenotípica para a detecção de células *Natural Killer* (NK) obtidas através da seleção de **R1** no gráfico inicial de morfologia FSC X SSC (**A**), seguida pela exclusão do *gate* **R2** em **C**, para seleção de células com marcação negativa para CD3, e, finalmente, identificação das células com positividade para CD49b (**R3** em **E**). Para se detectar marcação positiva para o receptor inibitório Ly49A em células NK CD3⁻CD49b⁺, foi realizado na sequência, um *gate* **R4** em **G**. Os isotipos controles IgG FITC (**B**), APC (**D**) e PE (**F**) foram utilizados para estabelecer o limite entre as regiões de fluorescência negativa e positiva.

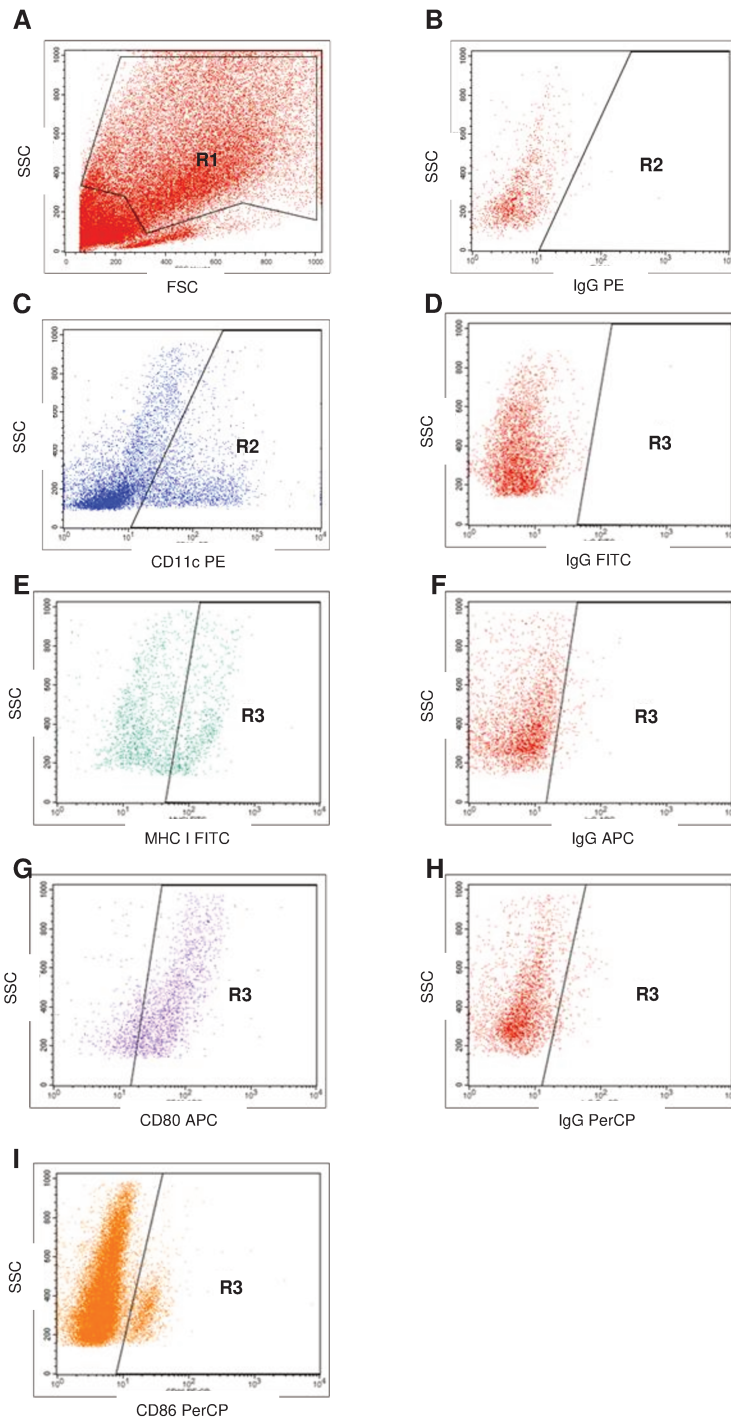


Figura 7: Imagens representativas da análise imunofenotípica para a detecção de células dendríticas obtidas através da seleção de **R1** no gráfico inicial de morfologia FSC X SSC (**A**), seguida da identificação de marcação positiva para CD11c (*gate* **R2** em **C**). A expressão de MHC I e das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 nestas células foi realizada, sequencialmente, a partir de **C**, através de delimitação dos *gates* **R3** em **E**, **G** e **I**, respectivamente. Os isotipos controles IgG PE (**B**), FITC (**D**), APC (**F**) e PerCP (**H**) foram utilizados para estabelecer o limite entre as regiões de fluorescência negativa e positiva.

4.6. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR)

4.6.1 Extração de RNA total

A extração do RNA total dos linfonodos mediastínicos metastáticos de animais tratados com Orlistat ou com etanol foi realizada com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen INC, Valencia, CA, E.U.A.), segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, o processo consistiu em adição de 600 µl do tampão RLT (fornecido pelo Kit), responsável por promover a lise das membranas celulares, aos órgãos linfóides (30 mg de tecido) previamente congelados e armazenados a -80°C. Em seguida, o material foi vigorosamente macerado em um microtubo de 1,5 ml, com auxílio de um homogeneizador de tecidos (*pellet pestle*) (Sigma) sobre o gelo e centrifugado a 20.200 *xg*, 4°C, durante 3 min. A solução sobrenadante foi transferida para um novo microtubo, que continha 600 µl de etanol a 70%, sendo homogeneizada por agitação. A amostra foi então aplicada à coluna *RNeasy spin* provida de microfiltros, acoplada a um tubo de 2 ml, e centrifugada a 10.600 *xg*, 4°C, durante 15 s. O filtrado foi descartado e a coluna foi lavada uma vez com o tampão RW1 e duas vezes com o tampão RPE (fornecidos pelo Kit). Ao final, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml e, para eluição do RNA, foram adicionados 40 µl de água livre de RNase (fornecida pelo Kit) diretamente sobre a membrana de sílica. O microtubo foi centrifugado a 10.600 *xg*, 4°C, durante 1 min, sendo então obtida a solução contendo o RNA total. Nos tumores primários, os RNAs totais foram purificados utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, o RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, usando-se o fator de correção próprio para o RNA. Foi também determinada a razão entre as medidas espectrofotométricas a 260 e 280 nm, o que nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração de cada RNA total extraído. Somente foram utilizadas as amostras com razão entre 1,6 e 2,0.

4.6.2. Gel analítico de agarose para RNA

Após a extração dos RNAs totais, a integridade dos mesmos foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 2 µg de RNA total em gel de agarose - formaldeído 1,2% corado com 10 mg/ml de brometo de etídeo (Invitrogen) (**Figura 8**).

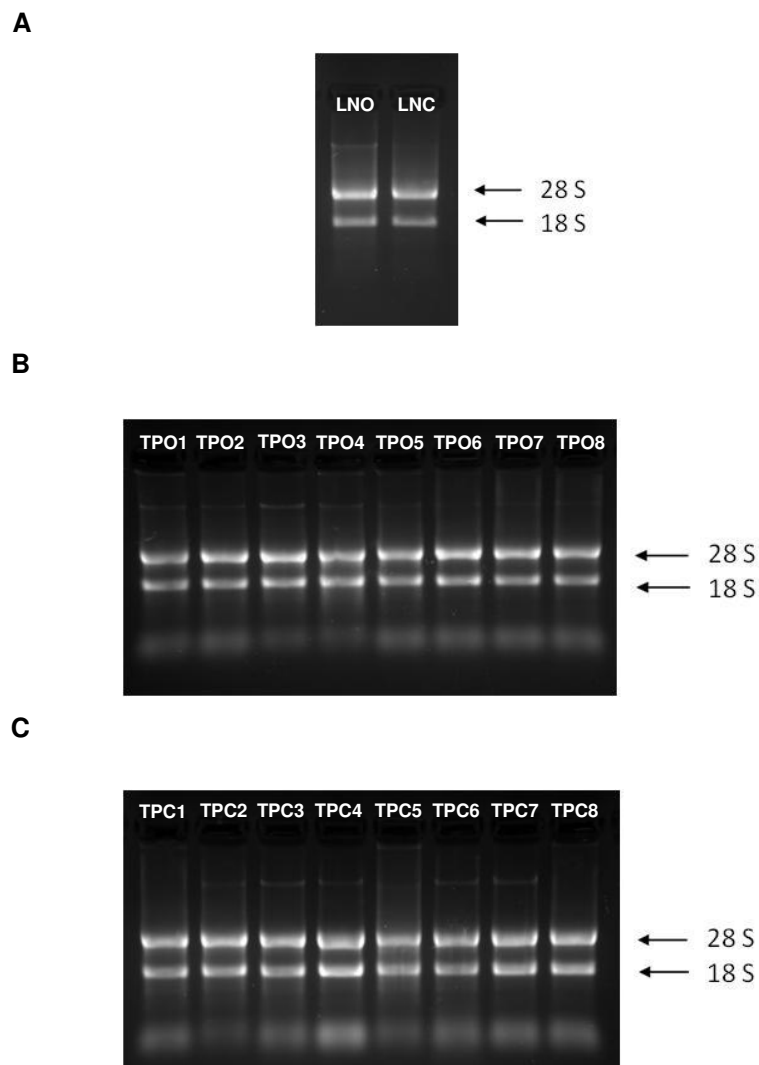


Figura 8: Géis representativos dos RNAs totais isolados a partir das amostras de linfonodos (LN) mediastínicos metastáticos (**A**) e de tumores primários (TP) (**B** e **C**) de camundongos tratados com Orlistat (**O**) e controles (**C**).

4.6.3. Reação de Transcrição Reversa (RT)

Antes das reações de RT, todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1 U de DNase I (Invitrogen) por 10 min a temperatura ambiente, com o objetivo de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico. Para a síntese dos cDNAs, 4 µg de RNA total foram reversamente transcritos em reações com volume final de 38 µl, contendo 0,5 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNase, 50 U da enzima Superscript III RT (Invitrogen) e 0,5 µg de *primers* oligo-dT (Invitrogen). As reações foram realizadas a 50°C por 50 min, seguidas de incubação a 70°C por 15 min.

4.6.4. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR foram realizadas no equipamento *Step One Plus*[™] (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.) utilizando-se o *SYBR*[®] *Green JumpStart*[™] *Taq ReadyMix*[™] (Sigma). Os primers (**Tabela 3**) utilizados para quantificar os níveis de RNAs mensageiros para granzima b e perforina foram delineados a partir das sequências dos respectivos RNAs mensageiros provenientes do *GenBank* (NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - NIH, E.U.A. - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com o auxílio do programa *Primer Express*[®] *software for Real Time PCR version 3.0* (Applied Biosystems). Os transcritos para granzima b, perforina, β-actina e GAPDH foram amplificados em reações de 25 µl contendo 2 µl de cada cDNA, 12,5 µl de *SYBR Green JumpStart*[™] *Taq ReadyMix*[™], 0,4 µM de cada primer e 9,5 µl de H₂O DNase e RNase *free* (Invitrogen). As condições das reações de PCR foram: 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95°C por 20 s e 60°C por 1 min e 1 ciclo de 95°C por 15s, 60°C por 1 min e 95°C por 15 s. Para normalização dos resultados, testamos individualmente os transcritos para GAPDH e β-actina, sendo o segundo mais adequado para nossas condições experimentais.

A análise da expressão gênica foi realizada através do método das curvas padrão. A expressão diferencial dos transcritos alvo foi determinada pelo método da quantificação relativa a amostras controle (amostras tratadas com etanol),

corrigidas pelo gene referência β -actina. Calculou-se a expressão gênica por equação matemática, que analisa individualmente as eficiências de amplificação de cada gene (SDS version 2.0, Applied Biosystems).

Tabela 3: Sequências dos primers para a amplificação dos transcritos de granzima b e perforina murinos

Descrição	Sequência	Código no Genbank
β -actina <i>Forward</i> β -actina <i>Reverse</i>	5'-ACCAGTTCGCCATGGATGAC-3' 5'-TGCCGGAGCCGTTGTC-3'	NM_007393.3A
GAPDH <i>Forward</i> GAPDH <i>Reverse</i>	5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA-3' 5'-GCG GCA CGT CAG ATC CA-3'	NM_008084
Granzima b <i>Forward</i> Granzima b <i>Reverse</i>	5'-CCCAGGCGCAATGTCAAT-3' 5'-CCCCAACCAGCCACATAGC-3'	NM_013542.2
Perforina <i>Forward</i> Perforina <i>Reverse</i>	5'-GCTCCACAGAGCATGCTTACC-3' 5'-CGTGATAAAGTGCGTGCCATA-3'	NM_011073.3

4.7. Coloração Oil Red “O”

Fragmentos congelados de tumores primários e de fígados foram seccionados em criostato (Leica Microsystem, Alemanha) na espessura de 5 μ m, fixados em solução contendo 40% de formol e 10% de CaCl_2 por 1 h e secos à temperatura ambiente (*Theory and Practice of Histological Techniques*, third edition, página 218). Os cortes foram a seguir corados com solução de Oil Red “O” (Sigma) a 0,5% em propilenoglicol por 16 h e contra-corados com hematoxilina de Mayer por 2 min, sendo montados com glicerina (*Laboratory Methods in Histotechnology*, 1992, AFIP).

4.8. Análise estatística

Para a comparação entre o número de metástases presentes nos animais controle e tratados com Orlistat foi utilizado o teste *t* de Student não pareado, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc. EUA). Foi considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do tratamento com Orlistat nos melanomas experimentais

Após o implante de células B16-F10 na cavidade peritoneal dos camundongos C57/Bl6, desenvolveram-se tumores primários e metástases em linfonodos mediastínicos de todos os animais estudados. Os tumores do grupo tratado apresentaram-se fragmentados e dispersos dentro da cavidade peritoneal, quando comparados aos do grupo controle, que foram bem delimitados e formados por uma massa única de consistência mais firme, na maioria dos casos no local onde as células B16-F10 haviam sido implantadas (**Figura 9**). Com relação ao número de linfonodos mediastínicos com metástases evidentes, houve uma inibição de aproximadamente 30% nos animais tratados com Orlistat, em cinco experimentos independentes (**Figura 10 e Tabela 4**).

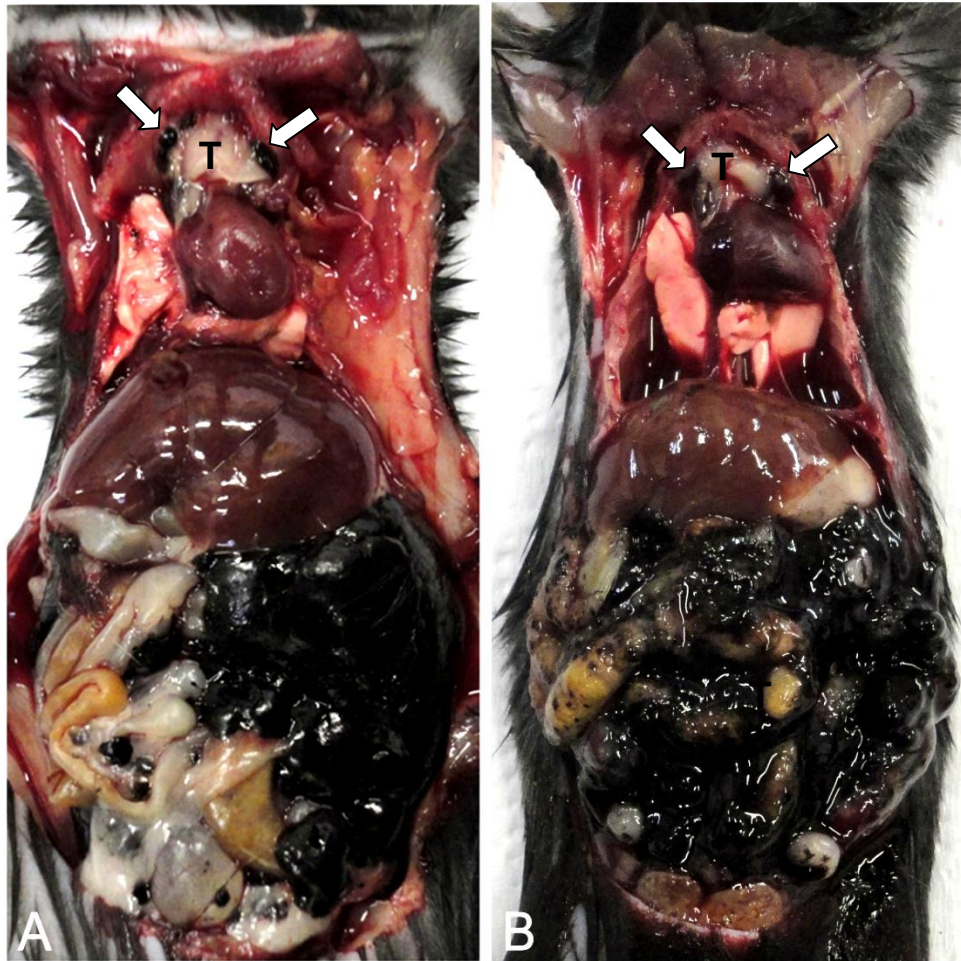


Figura 9: Imagens representativas do modelo de metástases espontâneas de melanoma em camundongos C57/Bl6. Em **A**, observa-se animal do grupo controle, que recebeu tratamento com etanol somente, com tumor primário relativamente bem delimitado e ocupando grande parte da cavidade peritoneal. Em **B** podemos notar, por toda cavidade peritoneal, o aspecto fragmentado e disperso do tumor primário de um camundongo tratado com Orlistat. Em ambas as imagens, observa-se a presença de linfonodos mediastínicos metastáticos (pequenos nódulos de coloração negra) na cavidade torácica destes animais (setas). T: Timo.

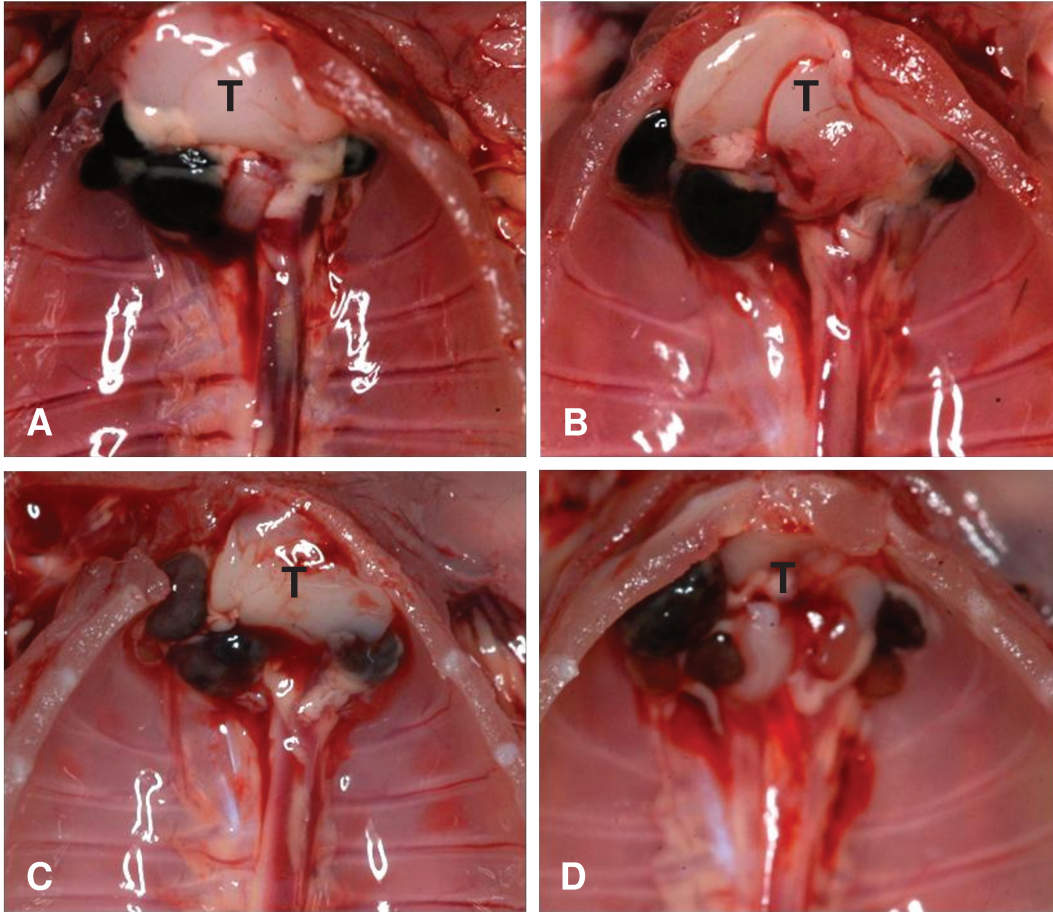


Figura 10: Imagens representativas das metástases espontâneas de melanoma para linfonodos mediastínicos, em camundongos dos grupos controle e tratado. Observa-se, em **A** e **B**, a cavidade torácica de dois animais do grupo controle após a remoção dos pulmões, do coração e elevação do osso esterno. Os nódulos esféricos e enegrecidos adjacentes ao timo (T) representam as metástases. Em **C** e **D**, podemos notar a presença das metástases linfonodais com tamanho discretamente menor e coloração acinzentada em dois animais tratados com Orlistat.

Tabela 4: Efeito do tratamento com Orlistat sobre o número de metástases linfonodais espontâneas em melanomas experimentais

Experimento	Número de camundongos por grupo	Controle Linfonodos metastáticos (média por animal)*	Orlistat Linfonodos metastáticos (média por animal)*
1	8	42 (5,25)	29 (3,62)
2	8	49 (6,12)	30 (3,75)
3	8	43 (5,37)	34 (4,25)
4	8	40 (5,00)	28 (3,50)
5	8	45 (5,63)	32 (4,00)
Total	40	219 (5,47)*	153 (3,82)*

*p < 0,001, teste *t* de Student

5.2. Análise das células imunes presentes nos tumores primários e linfonodos metastáticos

Após diversos ensaios de padronização, da análise em citometria de fluxo, a imunofenotipagem foi realizada em dois experimentos independentes, totalizando 20 camundongos C57/Bl6 cada (10 controles e 10 tratados com Orlistat). Após 12 dias de tratamento, as células presentes nos tumores primários e linfonodos mediastínicos metastáticos foram isoladas com o propósito de se averiguar a influência do Orlistat na quantidade e estado de ativação das células imunes neles presentes. Para tanto, foram utilizados os anticorpos específicos descritos na **Tabela 2**. Nos gráficos de morfologia FSC X SSC dos tumores primários (**Figuras 11 A e B**), a delimitação da região R1 (provável localização da subpopulação de células menores e menos complexas, incluindo os LT e NK) somente foi possível no grupo controle. No grupo tratado, observou-se que a população contendo os linfócitos não se destacou do restante das células tumorais e que, a partir de R1 (**Figura 11 B**), a análise posterior da marcação com anticorpos específicos anti-CD3 e anti-CD49b foi negativa (**Figuras 11 C e D**). No grupo controle, os tumores primários apresentaram um baixo percentual de LTs CD3⁺CD8⁺ (0,36%) e de células NK CD3⁻CD49b⁺ (0,27%) (**Figura 12**). Além disso, as CDs não puderam ser identificadas nos tumores primários, através da metodologia utilizada.

Por outro lado, nos linfonodos metastáticos (**Figura 13**), não houve diferenças estatisticamente significantes nas proporções de LT CD8⁺, NK CD49b⁺ e CD CD11c⁺ entre os grupos controles e tratados. Entretanto, observou-se uma redução aparentemente expressiva dos subtipos LTCD8⁺ e NK, assim como um discreto aumento de CDs nos camundongos tratados, quando comparados aos seus respectivos controles.

Adicionalmente, as CDs CD11c⁺ presentes nas metástases linfonodais do grupo tratado apresentaram uma menor expressão de MHC I e das moléculas co-estimulatórias CD80/86 ($p=0,05890$; $p=0,1440$ e $p=0,7357$, respectivamente, teste *t* de Student), o que sugere que estas células possam estar menos ativadas (**Figura 14**). Com relação ao receptor Ly49A, inibidor da atividade citolítica de

NKs, sua expressão foi maior nos linfonodos do grupo tratado, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas ($p=0,2692$, teste t de Student) (**Figura 15**). Nos tumores primários do grupo controle, 16% das células NK apresentaram expressão de Ly49A (dados não mostrados). Não foi possível realizar comparação com o grupo tratado, devido à imunodepleção desta subpopulação nestes animais.

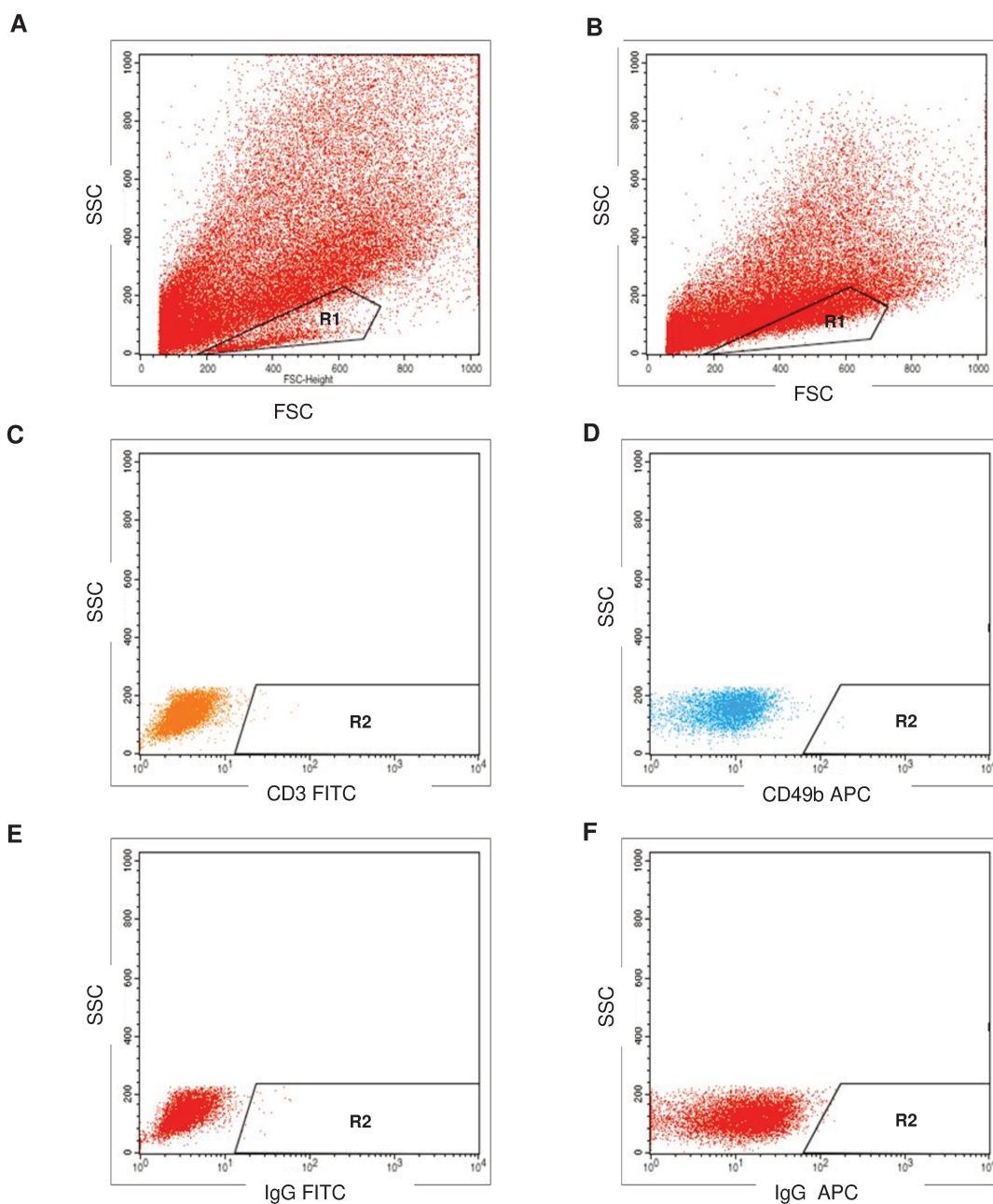


Figura 11: Estratégia de *gates* a partir do gráfico inicial de morfologia *FSC X SSC*. Em tumores primários, diferentemente do grupo controle (Figura **A**), no qual a população de células pequenas e menos complexas presentes em **R1** (local provavelmente ocupado por LTs e células NK) destaca-se do restante de células tumorais, no grupo tratado (Figura **B**) não foi possível identificar o mesmo padrão. Além disto, a ausência de imunopositividade para LTs (CD3) e células NK (CD49b), em **R2** da Figura **B**, sugere uma imunodepleção decorrente do tratamento com Orlistat (Figuras **C** e **D** – obtidas a partir de **R1** em **B**). Os isotipos controles IgG FITC (Figura **E**) e APC (Figura **F**) foram utilizados para estabelecer o limite entre as regiões de fluorescência negativa e positiva.

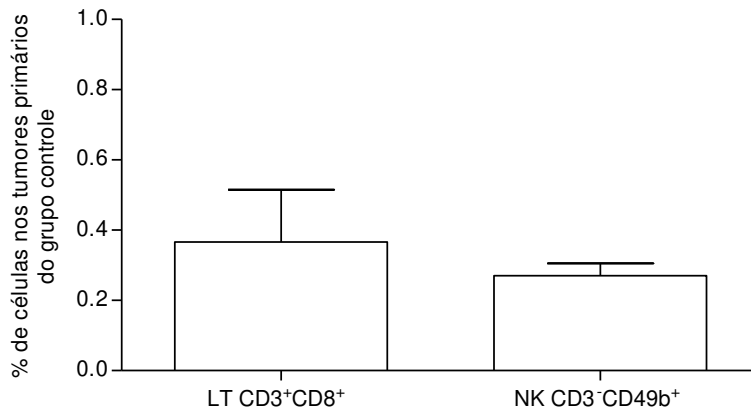


Figura 12: Imunofenotipagem de células imunes intratumorais dos grupos controle. LTs CD8⁺ e células NK foram identificados através de citometria de fluxo, após imunomarcagem com anticorpos específicos descritos na **Tabela 2**. Nota-se que os tumores primários do grupo controle apresentaram um baixo percentual de LTs CD3⁺CD8⁺ (0,36%) e de células NK CD3⁻CD49b⁺ (0,27%). CDs não puderam ser identificadas nos tumores primários, através da metodologia utilizada. As barras representam as médias e os desvios padrão de dois experimentos independentes.

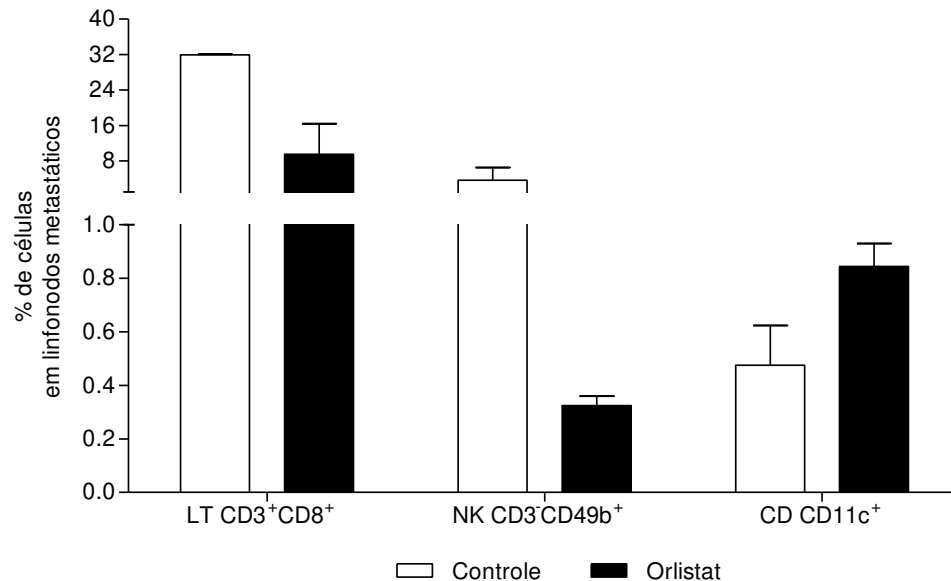


Figura 13: Imunofenotipagem, através de citometria de fluxo, de células imunes presentes nos *pools* de linfonodos mediastínicos metastáticos no modelo experimental de melanoma murino (B16-F10 / C57/Bl6). Após o tratamento com Orlistat ou etanol (controle), não houve diferenças estatísticas significativas dos subtipos de células imunes LT CD3⁺CD8⁺, NK CD3⁻CD49b⁺ e CD CD11c⁺ ($p=0,0828$; $p=0,2361$ e $p=0,1115$, respectivamente, teste *t* de Student). Entretanto, nota-se redução dos subtipos LT CD3⁺CD8⁺ e NK CD3⁻CD49b⁺, assim como um discreto aumento de CDs CD11c⁺ nos linfonodos metastáticos dos camundongos tratados, quando comparados aos seus respectivos controles. As barras representam as médias e os desvios padrão de dois experimentos independentes

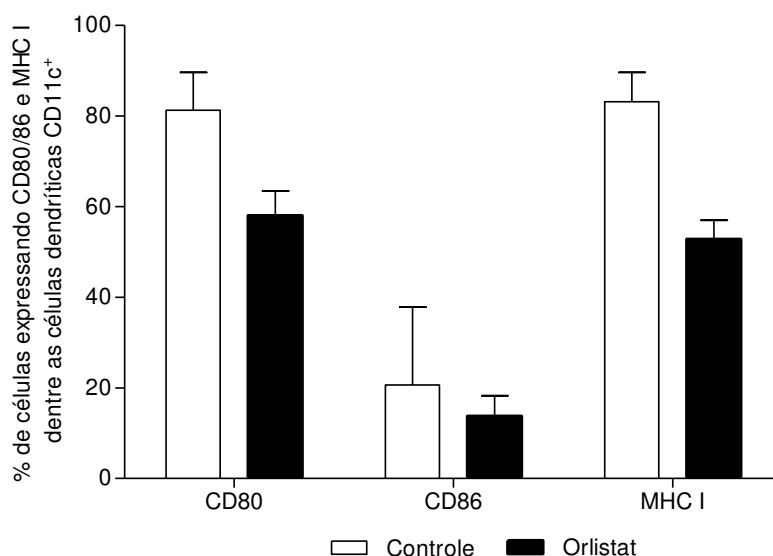


Figura 14: Análise da expressão das proteínas de superfície CD80, CD86 e MHC I nas células dendríticas CD11c⁺, através de citometria de fluxo. Não houve diferenças significativas no estado de ativação destas células, avaliado pela expressão das moléculas co-estimulatórias CD80/86 e de MHC I ($p=0,1440$; $p=0,7357$ e $p=0,0589$, respectivamente, teste t de Student). Entretanto, as células CD11c⁺ presentes nos linfonodos mediastínicos metastáticos do grupo tratado apresentaram redução na positividade para estas três moléculas, sugerindo que as CDs de camundongos tratados com Orlistat possam estar menos ativadas, quando comparadas às do grupo controle. As barras representam as médias e os desvios padrão de dois experimentos independentes.

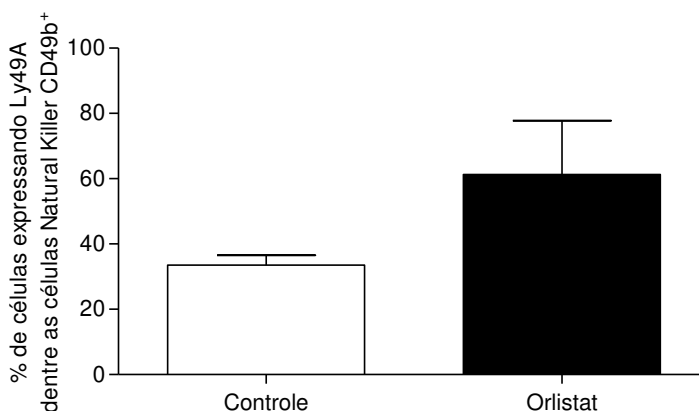


Figura 15: Análise da expressão do receptor inibitório Ly49A em células NK CD3⁺CD49b⁺ presentes nos *pools* de linfonodos mediastínicos metastáticos, através de citometria de fluxo. Após o tratamento com Orlistat ou etanol (controle), nota-se que as células NK CD3⁺CD49b⁺ do grupo tratado apresentaram uma maior expressão de Ly49A (61,10%), quando comparadas às do grupo controle (33,54%), embora as diferenças não tenham sido significantes do ponto de vista estatístico ($p=0,2692$, teste t de Student). Este resultado sugere que as NKs do grupo tratado possam apresentar uma menor atividade citolítica. As barras representam as médias e os desvios padrão de dois experimentos independentes.

5.3. Efeito do Orlistat sobre a expressão dos RNAs mensageiros de granzima b e perforina nos linfonodos mediastínicos metastáticos

Devido às alterações encontradas em relação às porcentagens de LT CD8⁺ e NK presentes em LN mediastínicos metastáticos de camundongos tratados com Orlistat, verificamos a seguir o perfil de ativação destas células imunes. Para tanto, estudamos a expressão relativa de granzima b e de perforina, que desempenham funções importantes durante o processo de lise de células tumorais. Cada cDNA utilizado para as reações foi obtido a partir dos RNAs totais dos *pools* de linfonodos coletados de 8 camundongos tratados e 8 camundongos controles, totalizando 48 animais distribuídos em três experimentos independentes.

Verificamos, na **Figura 16**, que a produção de RNAs mensageiros para granzima b e perforina foi reduzida pelo tratamento com Orlistat. Nos tumores primários, apesar da elevada quantidade de RNA utilizada, não foi possível a amplificação de seus respectivos mensageiros (dados não mostrados).

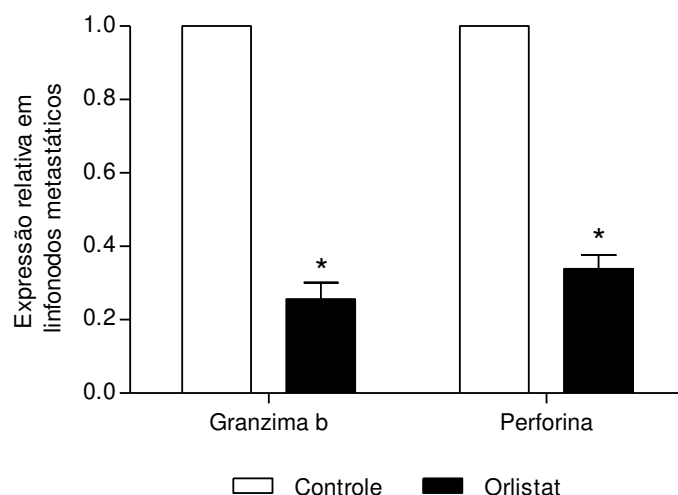


Figura 16: Análise por qRT-PCR dos níveis de RNAs mensageiros para granzima b e perforina nos *pools* de linfonodos mediastínicos metastáticos, após o tratamento dos camundongos C57/Bl6 com Orlistat. Observa-se que houve uma redução significativa de RNAs mensageiros tanto para granzima b como para perforina, em relação aos seus respectivos controles (* $p < 0,005$; teste *t* de Student). As barras representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes.

5.4. Comprovação da inibição de FASN pelo Orlistat

Com intuito de se comprovar que houve redução sistêmica na atividade de FASN nos animais estudados e que a redução do número de linfonodos mediastínicos metastáticos ocorreu devido ao tratamento com Orlistat, a atividade lipogênica de FASN foi avaliada nos fígados destes animais através de colorações de cortes por congelação com Oil Red “O”. Como esperado, os fígados de camundongos do grupo controle apresentaram uma grande quantidade de gotículas de lipídeo (depósitos de gordura com formato arredondado e com coloração vermelha) por toda a extensão dos cortes analisados (**Figura 17 A**). Em contraste, no grupo tratado, a quantidade e o tamanho das gotículas de lipídeo foi reduzida (**Figura 17 B**). Estes resultados sugerem que a redução do número de metástases espontâneas de melanoma nos camundongos tratados ocorreu devido à inibição de FASN com Orlistat, uma vez que a redução da síntese endógena de ácidos graxos foi comprovada. Além do mais, indicam que os efeitos observados sobre o sistema imune sejam decorrentes dos tratamentos estudados.

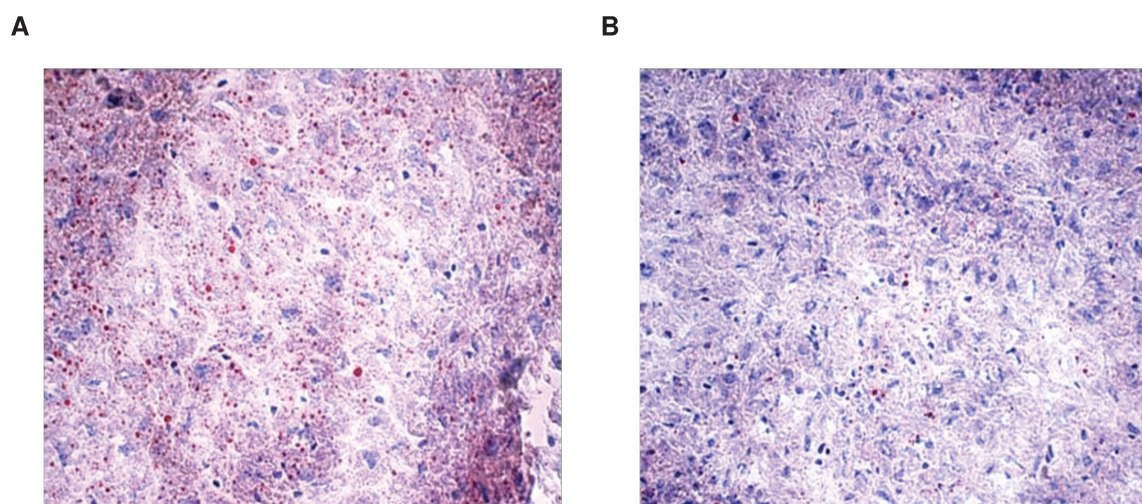


Figura 17. Fotomicrografias representativas da coloração para lipídios com Oil Red “O” em cortes por congelação realizados em fígados de camundongos tratados ou não com Orlistat. Os hepatócitos dos camundongos controle apresentaram uma grande quantidade de gotículas de gordura no interior do citoplasma, por toda extensão dos tecidos analisados (**A**). No grupo tratado, as gotículas apresentaram-se em menor quantidade e com tamanho reduzido, sendo mais esparsas pelo tecido (**B**). Aumento original A e B: 400X.

6. DISCUSSÃO

De acordo com a literatura científica, diversos estudos evidenciaram que o tratamento de células provenientes de neoplasias malignas com Orlistat, através da inibição de FASN, resulta em bloqueio da progressão do ciclo celular com consequente redução da proliferação e aumento das taxas de morte celular por apoptose (de Schrijver *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2004c; Carvalho *et al.*, 2008; Dowling *et al.*, 2009; Murata *et al.*, 2010; Zecchin *et al.*, 2011), inibição da angiogênese (Browne *et al.*, 2006) e sensibilização à ação de quimioterápicos (Liu *et al.*, 2008). Em nosso laboratório, Carvalho *et al.* (2008) demonstraram que a inoculação de células de melanoma murino B16-F10 na cavidade peritoneal de camundongos C57/BL6 resulta no desenvolvimento de metástases espontâneas para os linfonodos mediastínicos em todos os casos. Neste mesmo trabalho, o tratamento destes animais com Orlistat provocou, além da diminuição da síntese endógena de lipídios, uma fragmentação do tumor primário e redução de 50% no número de metástases linfonodais. Para os experimentos desta dissertação, foi utilizado o mesmo modelo experimental de melanoma murino (B16-F10 / C57/BL6), verificando-se resultados semelhantes em todos os aspectos relacionados ao trabalho anterior. Todavia, com relação ao número de metástases linfonodais, os camundongos tratados com Orlistat no presente estudo apresentaram uma taxa de inibição de aproximadamente 30%. Esta diferença pode ter ocorrido devido ao fato de os animais utilizados nesta dissertação apresentarem seis semanas de idade no início dos experimentos, ao contrário de oito a nove semanas no trabalho de Carvalho *et al.* (2008). Outras variáveis, como o cultivo celular ou lote da droga, podem também ter influenciado no resultado.

É importante ressaltar que já foi demonstrado que quimioterápicos não somente possuem uma ação citóxica direta sobre células neoplásicas, mas também podem potencializar ou suprimir os componentes do sistema imune (Lake & Robinson, 2005; Audia *et al.*, 2007; Vento *et al.*, 2008; Zitvogel & Kroemer, 2009). Contudo, uma possível relação entre a inibição de FASN com Orlistat e o

sistema imunológico não foi relatada até o momento pela literatura. Devido a isto, o presente estudo pretendeu avaliar se haveria uma associação entre tratamento com Orlistat, a significativa redução do processo metastático e a resposta imune contra o melanoma. Alguns estudos mostraram que drogas utilizadas no tratamento contra o câncer, em baixas concentrações, podem provocar apoptose em células tumorais, além exercer efeitos positivos sobre o sistema imune, como o aumento da apresentação de antígenos tumorais pelas CDs e expansão de LTCD8⁺ (Nonwak *et al.*, 2003; Shurin *et al.*, 2009). Ramakrishnan *et al.* (2010) utilizaram as drogas antineoplásicas paclitaxel, doxorrubicina e cisplatina no tratamento de células de linfoma T murino EL4 e constataram que as três drogas foram capazes de sensibilizar as células neoplásicas aos efeitos citotóxicos de LTCD8⁺ através da permeabilização para entrada de Grb, a partir de mecanismos independentes de Prf. O quimioterápico Imatinib é utilizado para o tratamento do tumor estromal gastrointestinal (TEG) e tem apresentado resultados bastante efetivos, tais como resposta clínica (avaliada através da regressão parcial ou estabilização da lesão) em aproximadamente 80% dos pacientes com TEG avançado e aumento significativo da sobrevida de nove meses para mais de cinco anos (Demetri *et al.*, 2002; Blanke *et al.*, 2008). O mecanismo de ação desta droga está associado à capacidade de inibição do gene KIT, cujo produto receptor de tirosina-quinase dirige sinais para a proliferação e sobrevivência tumoral (revisado por Kim & Zalupski, 2011). Um estudo realizado por Balachandran *et al.* (2011) demonstrou que camundongos transgênicos que espontaneamente desenvolveram TEG e foram tratados com Imatinib apresentaram uma redução significativa do peso dos tumores. Neste mesmo estudo, comprovou-se que além da inibição de KIT pelo Imatinib, este resultado foi decorrente do aumento do número e ativação de LTCD8⁺ e indução de apoptose de LTregs associada à inibição da enzima IDO nesta neoplasia, o que contribuiu para os efeitos antitumorais desta droga. Em melanomas, algumas drogas tais como dacarbazina (Palermo *et al.*, 2010; Nardin *et al.*, 2011), bortezomib (Seeger *et al.*, 2010), curcumina (Bill *et al.*, 2009) e L-PAM (Ben-Efraim, 2001), dentre outras promovem

efeitos citotóxicos diretos contra as células neoplásicas, além suscitem uma resposta imune antitumoral. Além destas, a literatura científica tem relatado alguns medicamentos utilizados na terapia contra melanomas que não interferem na viabilidade ou função de células imunes (vemurafenib, também descrita como PLX4032 e RG7204) e outros que ainda não foram correlacionados com a resposta imune (verapamil e tamoxifen) (Andersson *et al.*, 2003; Matsuoka *et al.*, 2009; Comin-Anduix *et al.*, 2010). Adicionalmente, alguns estudos realizaram uma combinação de quimioterápicos associados à imunoterapia com IFN- γ , IL-2, ipilimumab, cimetidine, OX40 e imidazoquinolide, como forma de se aumentar a efetividade da resposta antitumoral e utilizar o sistema imunológico como aliado nesta estratégia contra o melanoma, o que resultou em bons resultados, já que as células imunes em maior número e mais ativadas junto às drogas citotóxicas inibiram a proliferação de células neoplásicas (Szincszák *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2003; Hirschhorn-Cymerman *et al.*, 2009; Jilaveanu *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2011; Graziani *et al.*, 2012).

Em contraste, a partir de análises realizadas através de citometria de fluxo, nossos resultados sugerem que o Orlistat possa exercer efeitos supressores sobre os componentes do sistema imune, uma vez que os camundongos inoculados com células de melanoma murino e tratados com esta droga apresentaram uma redução aparentemente expressiva no número de LTCD8⁺ e células NK nos linfonodos mediastínicos metastáticos. Ademais, um interessante dado encontrado em nosso trabalho foi a ausência da característica população de linfócitos (LTCD8⁺ e NK) nas amostras provenientes dos tumores primários de camundongos que foram submetidos ao tratamento com Orlistat, a qual normalmente deveria estar situada na parte inferior esquerda em um gráfico do tipo FSC X SSC. A negatividade para os anticorpos anti-CD3 e anti-CD49b confirma tais achados. Isto sugere que a inibição de FASN causa, por alguma razão, uma depleção destas células imunes. Nesse sentido, uma provável explicação para estes resultados talvez seja de que a produção endógena de AG pela FASN possa também ser crítica para a viabilidade de células não

neoplásicas, incluindo as células imunes. Esta hipótese pode ser comprovada, pelo menos em parte, pelo estudo de Almeida *et al.* (2005), que demonstrou que o tratamento com cerulenina reduz o crescimento de culturas primárias de fibroblastos gengivais humanos normais. Da mesma forma, Browne *et al.* (2006) mostraram que o Orlistat é capaz de reduzir a proliferação de células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano.

Nossos achados sugerem que a inibição de FASN com Orlistat interfere nas porcentagens destas células efectoras e, portanto, o próximo passo consistiu em avaliar o grau de ativação das mesmas no microambiente tumoral sob influência ou não do tratamento. Já foi demonstrado que as proteases Prf e Grb, marcadores de ativação associados à função citolítica de células NK e LTCD8⁺, exercem um papel central na imunidade antitumoral (Kontani *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2007; Hoves *et al.*, 2010), uma vez que animais *knockout* para Prf apresentam uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores e metástases (Kägi *et al.*, 1994; van de Broek *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 1999) e que LTCs deficientes em Grb possuem uma menor capacidade de eliminar células-alvo (Heusel *et al.*, 1994; Shresta *et al.*, 1995; Cullen *et al.*, 2010). A função de células NK é controlada pelo equilíbrio entre sinais de ativação e inibição. Receptores inibitórios se ligam às moléculas MHC I, enquanto os receptores ativadores se associam aos ligantes expressos em células neoplásicas ou infectadas por vírus (Wallace & Smyth, 2005). Em nosso estudo, encontramos que a expressão de RNAs mensageiros para Grb e Prf, verificada através de qRT-PCT em linfonodos metastáticos, foi significativamente menor no grupo tratado com Orlistat. Adicionalmente, através de citometria de fluxo, constatamos maior expressão do receptor inibidor de atividade citolítica Ly49A, presente nas células NK CD49b⁺ de linfonodos metastáticos de animais tratados. Estes resultados estão em concordância com os achados de Udoji *et al.* (2010), que avaliaram a citotoxicidade das células NK, previamente submetidas a diferentes tempos de exposição e concentrações de triclosan, outro inibidor da atividade de FASN, sobre as células K562, de linhagem derivada de leucemia humana, através do ensaio de liberação de ⁵¹Cr radioativo *in*

vitro. Neste estudo, foi demonstrado que o triclosan provocou uma significativa perda progressiva e persistente da capacidade das células NK lisarem células K562. Portanto, estes trabalhos, em conjunto, sugerem que a inibição da atividade de FASN também possa ter influenciado no estado de ativação e reduzido a capacidade citolítica destas células efectoras.

Nossos dados também sugerem que apesar de ter ocorrido um discreto aumento não significativo na porcentagem de CD CD11c⁺ nos linfonodos metastáticos do grupo tratado com Orlistat, estas têm provavelmente uma menor capacidade de apresentação de antígenos tumorais aos LTs. Isto porque, a partir das nossas análises de citometria fluxo, verificamos uma menor porcentagem na expressão de MHC I e das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 nestas células. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho realizado por Falo *et al.* (1987), que investigaram os efeitos da cerulenina sobre a habilidade das APCs apresentarem antígenos aos LTs. Neste estudo, foi demonstrado que apesar da cerulenina não alterar o processo de captura e catabolismo de antígenos das APCs, foi capaz de interferir no processamento de antígenos e bloquear a apresentação dos mesmos aos LTs. Estudos têm sugerido que as modificações pós-traducionais, através da adição de lipídeos, pode auxiliar as proteínas a se associarem às membranas intra e extracelulares (Magee & Seabra, 2005; Meinnel & Giglione, 2008; Brunsveld *et al.*, 2009). Portanto, é possível especular que talvez seja devido ao fato de AG serem imprescindíveis para a formação de componentes lipídicos fundamentais para a correta formação das membranas celulares, o tratamento com inibidores de FASN possa afetar a função de APCs.

Em humanos, AG servem de substrato metabólico para obtenção de energia, são componentes estruturais de membranas celulares e atuam como mensageiros intracelulares (revisado por Kremmyda *et al.*, 2011). Além disso, os AG poliinsaturados são precursores de prostaglandinas (PG), tromboxanos (TBX) e leucotrienos (LCT), os quais são importantes mediadores da resposta inflamatória (Tvrzická *et al.*, 2009). Tauchi-Sato *et al.* (2002) descreveram que corpos lipídicos

são organelas envolvidas no metabolismo lipídico, formadas por várias proteínas de diferentes composições e uma monocamada de fosfolipídeos composta por um único tipo de AG que envolve uma região central rica em lipídeos. Estas apresentam uma importante função na síntese e secreção de mediadores inflamatórios, como o ácido araquidônico (AA), que é um ácido graxo poliinsaturado, sinalizador intracelular e precursor de PG e LCT, essencial para os leucócitos durante a resposta inflamatória (Weller *et al.*, 1989) e para a proliferação de células neoplásicas (revisado por Bozza *et al.*, 2011). Accioly *et al.* (2008) demonstraram recentemente que o tratamento com aspirina ou com C75, inibiu a síntese de PGE₂ e a proliferação de células de carcinoma de cólon. Estes achados foram correlacionados com o bloqueio da formação de corpos lipídicos nestas células neoplásicas, sugerindo que estas organelas possam estar envolvidas na patogênese desta neoplasia. Adicionalmente, os resultados encontrados por Bozza *et al.* (1996) sugeriram que a inibição da produção de AG para a formação de corpos lipídicos em leucócitos através da utilização de aspirina e de anti-inflamatórios não esteróides (AINES) também inibiu a síntese de LCT e PG, através de mecanismos independentes da inibição da ciclooxigenase (COX), enzima responsável pela conversão de AA em importantes produtos para a resposta inflamatória, tais como PG e TBX. Estes dados corroboram e auxiliam a compreensão dos nossos resultados, uma vez que demonstramos que o tratamento com Orlistat possivelmente interfere nos componentes do sistema imunológico e que a produção de AG pela FASN provavelmente seja essencial para a proliferação de células neoplásicas e, ao mesmo tempo, para uma resposta imune efetiva.

O melanoma é conhecido pela sua rápida progressão e baixa responsividade à radioterapia e aos quimioterápicos (Soengas & Lowe, 2003). Inflamação crônica pode se estabelecer no microambiente desta neoplasia, sendo caracterizada pela infiltração de leucócitos, principalmente de MDSCs bloqueadoras da atividade de LTCs, e mediadores solúveis que levam à imunossupressão associada à progressão tumoral (Umansky & Sevko, 2012). Devido a isso, a maioria dos

protocolos de tratamento desta neoplasia consta de combinações de terapias adjuvantes, com intenção de se obter um efeito sinérgico (Stein & Brownell, 2008). Uma vez que já foram relatados os efeitos antiproliferativos e antitumorais do Orlistat sobre linhagens celulares provenientes de diferentes neoplasias malignas (Agostini *et al.*, 2004; Kridel *et al.* 2004; Knowles *et al.* 2004; Menendez *et al.*, 2005a; Menendez *et al.*, 2005b; Carvalho *et al.*, 2008), os estudos do nosso grupo pretendem avaliar os vários componentes do microambiente tumoral que possam eventualmente sofrer alterações devido à ação desta droga, como por exemplo, sua capacidade de interferir na angiogênese, linfangiogênese, matriz extracelular e, quanto ao presente trabalho, no sistema imunológico. Com relação a este último, somente foram abordadas as alterações causadas pelo tratamento com Orlistat sobre as CDcs e as células imunes efetoras antitumorais LTCD8⁺ e NK, entretanto, não avaliamos, até o momento, os efeitos desta droga sobre os demais componentes do sistema imune que possuem atividades pró-tumorais, tais como macrófagos M2, neutrófilos N2, MDSCs, CDregs e LTregs. Um trabalho paralelo ao apresentado nesta dissertação está sendo desenvolvido em nosso laboratório. Neste, estão sendo avaliados os efeitos do Orlistat sobre a porcentagem de LTs CD4⁺, LTregs, macrófagos e neutrófilos presentes nos tumores e linfonodos mediastínicos metastáticos, através de citometria de fluxo, utilizando-se o mesmo modelo animal. Além disso, pretende avaliar a influência desta droga sobre a expressão de citocinas inflamatórias e da enzima iNOs (óxido nítrico sintase) secretadas a partir de macrófagos tumorais *ex vivo* estimulados em cultura de células com LPS bacteriano, através de qRT-PCR (dados não publicados). Estes estudos irão completar os resultados mostrados aqui e auxiliar na compreensão do efeito deste inibidor de FASN sobre o sistema imunológico, frente à presença de melanomas em desenvolvimento.

Um estudo realizado por Zhang *et al.* (2008) demonstrou que o tratamento de pacientes portadores de carcinoma de pulmão com paclitaxel, um inibidor mitótico utilizado na quimioterapia contra o câncer, não somente elevou os níveis de produção das citocinas IFN- γ e IL-2 e de expressão do marcador de ativação

CD44 em LTCD8⁺ e LTCD4⁺, mas também foi capaz de reduzir seletivamente a população de LTregs por indução de apoptose, sem alterar significativamente o número de células T efetoras. Estes resultados sugerem que o paclitaxel também utiliza mecanismos imunomodulatórios para combater neoplasias. Adicionalmente, Beyer *et al.* (2005) avaliaram a capacidade do medicamento fludarabine, utilizado na quimioterapia contra leucemia linfocítica crônica (LLC), causar ou não impacto sobre a frequência e função de LTregs. Este estudo avaliou o sangue periférico de pacientes portadores desta neoplasia e mostrou que, após o tratamento com fludarabine, houve uma redução significativa de LTregs, acompanhada de uma menor função inibitória destas células, avaliadas quanto à capacidade de inibir a proliferação e produção de IFN- γ pelos LTCD4⁺. Neste mesmo estudo, experimentos *in vitro* demonstraram que este quimioterápico foi capaz de induzir apoptose em LTregs. Ainda neste estudo, os autores sugerem que o fludarabine não somente suprime a ação de LTCD8⁺, como já demonstrado no trabalho de Gamberale *et al.* (2003), mas também é capaz de exercer o mesmo efeito sobre LTregs. Em contraste, em um ensaio clínico realizado com pacientes portadores de carcinoma metastático (mama, pulmão, rim, estômago, colorretal, próstata e bexiga) em estágio avançado tratados com infusão única de ciclofosfamida associada à imunoterapia intratumoral com o bacilo *Calmette - Guérin* (BCG) houve um aumento significativo na população de LTregs em sangue periférico (Audia *et al.*, 2007). Portanto, ao finalizarmos nossos trabalhos poderemos analisar a abrangência de ação do Orlistat e verificar também se o mesmo apresenta capacidade de influenciar ou não a resposta imune pró-tumoral. Possíveis interferências em células reguladoras, como a inibição de LTregs devido ao tratamento com Orlistat podem ser favoráveis aos efeitos antitumorais deste medicamento, mas, caso ocorra, este resultado deve ser analisado com cautela e interpretado em conjunto aos demais aspectos abordados.

Os resultados desta dissertação sugerem que o Orlistat, apesar de apresentar propriedades antitumorais contra o melanoma, possa ao mesmo tempo exercer efeitos adversos sobre o sistema imunológico, provocando uma depleção

de células imunes efectoras e alterações no estado de ativação, tornando-as menos potentes para uma resposta imune efetiva contra tumores e, portanto, comportar-se como um agente imunossupressor. Entretanto, acreditamos que, futuramente, a realização de um estudo em que se avalie a combinação da utilização de Orlistat como quimioterápico associado a diferentes tipos de imunoterapias possa resultar em resultados benéficos e efetivos no combate ao câncer.

7. CONCLUSÕES

7.1. O número de metástases para linfonodos mediastínicos foi reduzido em 30% em camundongos C57/Bl6 inoculados com células B16-F10 devido ao tratamento com Orlistat.

7.2. LTCD8⁺ e células NK apresentaram-se em uma porcentagem reduzida nos tumores primários dos animais do grupo controle e estavam ausentes no grupo tratado com Orlistat.

7.3. Nas metástases linfonodais dos animais do grupo tratado com Orlistat, houve uma menor porcentagem de LTCD8⁺ e células NK, além de um discreto aumento de CDs, quando comparados ao grupo controle.

7.4. Nas metástases linfonodais dos animais do grupo tratado, houve uma redução expressiva na capacidade de ativação/maturação de LTCD8⁺, células NK e CDs, em relação ao grupo controle.

7.5. A quantidade relativa de RNAs mensageiros para granzima b e perforina foi significativamente menor nos linfonodos metastáticos do grupo tratado com Orlistat, quando comparada ao grupo controle.

7.6. A inibição de FASN com Orlistat pode estar associada à imunossupressão em modelo de melanoma experimental.

7. REFERÊNCIAS

-Achen MG, Williams RA, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PAW, Lederman F, Roufail S, Stacker SA. Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. *J Pathol.* 2001; 193: 147 - 15.

-Agarwal A, Saraf S, Asthana A, Gupta U, Gajbhiye V, Jain NK. Ligand based dendritic systems for tumor targeting. *Int J Pharm.* 2008 Feb 28; 350 (1 - 2): 3 - 13.

-Agostini M, Silva S, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M *et al.* Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 2004; 40 (7): 728 - 735.

-Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011 Oct 12; 366 (1579): 2748 - 2755. Review.

-Ali OA, Emerich D, Dranoff G, Mooney DJ. In situ regulation of DC subsets and T cells mediates tumor regression in mice. *Sci Transl Med.* 2009 Nov 25; 1 (8): 8 - 19.

-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.

-Almeida JP, Coletta RD, Silva S, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L *et al.* The proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol* 2005; 76 (2): 272 - 278.

-Alò PL, Visca P, Botti C, Galati GM, Sebastiani V, Andreano T, Di Tondo U, Pizer ES. Immunohistochemical expression of human erythrocyte glucose transporter and fatty acid synthase in infiltrating breast carcinomas and adjacent typical/atypical hyperplastic or normal breast tissue. *Am J Clin Pathol.* 2001 Jul; 116 (1): 129 - 134.

-Alò PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, Serpieri DE, Di Tondo U. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep.* 2000; 7 (6): 1383 - 1388.

-Alò PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, Serpieri DE, Di Tondo U. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep.* 2000 Nov-Dec; 7 (6): 1383 - 1388.

-Alò PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer.* 1996 Feb 1; 77 (3): 474 - 482.

-Andersen MH, Pedersen LO, Capeller B, Bröcker EB, Becker JC, Thor Straten P. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Aug 15; 61 (16): 5964 - 5968.

-Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol.* 2006 Jan; 126 (1): 32 - 41. Review.

-Andersson R, Ake Hofer P, Riklund-Ahlström K, Henriksson R. Effects of interferon-alpha, verapamil and dacarbazine in the treatment of advanced malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2003 Feb; 13 (1): 87 - 91.

-Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, Herlyn M, Parmiani G. Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp Med.* 1993 Apr 1; 177 (4): 989 - 998.

-Arase, H., T. Saito, J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 2001. Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J Immunol.* 2001 Aug 1; 167 (3): 1141 - 1144.

-Arnon TI, Markel G, Mandelboim O. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Semin Cancer Biol.* 2006 Oct; 16 (5): 348 - 358. Review.

-Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, *et al*: Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: An antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer.* 2006; 94: 259 - 267.

-Asada H, Kishida T, Hirai H, Shin-Ya M, Imanishi J, Takeuchi M, Mazda O. Combination vaccine of dendritic cells (DCs) and T cells effectively suppressed preestablished malignant melanoma in mice. *Cancer Lett.* 2006 Aug 18; 240 (1): 83 - 93.

-Audia S, Nicolas A, Cathelin D, Larmonier N, Ferrand C, Foucher P, *et al*. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+ CD25+ T lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 2007 Dec; 150 (3): 523 - 530.

-Auluck A, Zhang L, Desai R, Rosin MP. Primary malignant melanoma of maxillary gingival - a case report and review of the literature. *J Can Dent Assoc.* 2008 May; 74 (4): 367 - 371.

-Autier P, Doré JF, Eggermont AM, Coebergh JW. Epidemiological evidence that UVA radiation is involved in the genesis of cutaneous melanoma. *Curr Opin Oncol*. 2011 Mar; 23 (2): 189 - 196.

-Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, Bamboat ZM, Ocuin LM, Obaid H, *et al*. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat Med*. 2011 Aug 28; 17 (9): 1094 - 1100.

-Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, *et al*. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 8; 106 (49): 20847 - 20852.

-Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, *et al*. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18: 767 - 811.

-Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, *et al*. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res*. 2001 Sep 1; 61 (17): 6451 - 6458.

-Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19; 392 (6673): 245 - 252.

-Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SJ, Hirota S, Hosobe S *et al*. Mechanisms of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66 (11): 5953 - 5940.

-Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC PRESS. 2005: 72 - 74.

-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.

-Baumgartner JM, Jordan KR, Hu LJ, Wilson CC, Banerjee A, McCarter MD. DC Maturation and Function are Not Altered by Melanoma-Derived Immunosuppressive Soluble Factors. *J Surg Res*. 2011 Aug 24. [Epub ahead of print]

-Ben-Efraim S. Immunomodulating anticancer alkylating drugs: targets and mechanisms of activity. *Curr Drug Targets*. 2001 Jun; 2 (2): 197 - 212.

-Bershteĭn 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.

-Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, *et al*. Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. 2005 Sep 15; 106 (6): 2018 - 2025.

-Bill MA, Bakan C, Benson DM Jr, Fuchs J, Young G, Lesinski GB. Curcumin induces proapoptotic effects against human melanoma cells and modulates the cellular response to immunotherapeutic cytokines. *Mol Cancer Ther*. 2009 Sep; 8 (9): 2726 - 2735.

-Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother*. 2007; 56: 739 - 745.

-Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, Ryan CW, von Mehren M, Benjamin RS, *et al.* Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J Clin Oncol.* 2008 Feb 1; 26 (4): 626 - 632.

-Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 1996; 184: 465 - 472.

-Bonilla FA; Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb; 125 (2 Suppl 2): 33 - 40.

-Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 175 - 208.

-Bousso P, Robey E. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol.* 2003 Jun; 4 (6): 579 - 585.

-Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier RA, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2011 Nov; 85 (5): 205 - 213.

-Brandstadter JD, Yang Y. Natural killer cell responses to viral infection. *J Innate Immun.* 2011; 3 (3): 274 - 279.

-Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, Häcker G. Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2009 Jul 1; 183 (1): 145 - 154.

-Brink J, Ludtke ST, Yang Chao-Yuh, Gu Zei-Wei, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (1): 138 - 143.

-Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Driving gene expression specifically in dendritic cells. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 417: 55 - 57.

-Browne CD, Hindmarsh EJ, Smith JW. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by Orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J* 2006; 20: 2027 - 2035.

-Brunsveld L, Waldmann H, Huster D. Membrane binding of lipidated Ras peptides and proteins - the structural point of view. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jan; 1788 (1): 273 - 288. Review.

-Brusselmans K, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2003 Oct 10; 106 (6): 856 - 862.

-Cao X. Regulatory T cells and immune tolerance to tumors. *Immunol Res.* 2010 Mar; 46 (1-3): 79 - 93.

-Capobianco A, Manfredi AA, Monno A, Rovere-Querini P, Rugarli C. Melanoma and lymphoma rejection associated with eosinophil infiltration upon intratumoral injection of dendritic and NK/LAK cells. *J Immunother.* 2008 Jun; 31 (5): 458 - 465.

-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 - 2565.

-Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct; 1(1): 41 - 49.

-Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, *et al*. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med*. 2006 Feb; 12 (2): 207 - 213.

-Chauvin C, Philippeau JM, Hémond C, Hubert FX, Wittrant Y, Lamoureux F, *et al*. Killer dendritic cells link innate and adaptive immunity against established osteosarcoma in rats. *Cancer Res*. 2008 Nov 15; 68 (22): 9433 - 9440.

-Chirala SS, Jayakumar A, Gu ZW, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 13; 98 (6): 3104 - 3108.

-Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K *et al*. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (11): 6358 - 6363.

-Chuang HY, Chang YF, Hwang JJ. Antitumor effect of orlistat, a fatty acid synthase inhibitor, is via activation of caspase-3 on human colorectal carcinoma-bearing animal. *Biomed Pharmacother*. 2011 Jul; 65 (4): 286 - 292.

-Chung JW, Yoon SR, Choi I. The regulation of NK cell function and development. *Front Biosci*. 2008 May 1; 13: 6432 - 6442.

-Clegg DJ, Wortman MD, Benoit SC, Mcosker CC, Seeley RJ. Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes* 2002; 51: 3196 - 3201.

-Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrada S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996 Apr 1; 77 (7): 1303 - 1310.

-Comin-Anduix B, Chodon T, Sazegar H, Matsunaga D, Mock S, Jalil J, *et al.* The oncogenic BRAF kinase inhibitor PLX4032/RG7204 does not affect the viability or function of human lymphocytes across a wide range of concentrations. *Clin Cancer Res*. 2010 Dec 15; 16 (24): 6040 - 6048.

-Correa I, Raulet DH. Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity*. 1995 Jan; 2 (1): 61 - 71.

-Cullen SP, Brunet M, Martin SJ. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ*. 2010 Apr; 17 (4): 616 - 623.

-de Andrade BA, León JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, Graner E, de Almeida OP. Expression of fatty acid synthase (FASN) in oral nevi and melanoma. *Oral Dis*. 2011 Nov; 17 (8): 808 - 812.

-D'Erchia AM, Tullo A, Lefkimmiatis K, Saccone C, Sbisa E (2006) The fatty acid synthase is a conserved p53 family target from worm to human. *Cell Cycle*. 2006: (5) 750 - 758.

-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 - 3804.

-de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jan; 6 (1): 24 - 37.

-Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, *et al.* Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 2002 Aug 15; 347 (7): 472 - 480.

-Dimasi N, Moretta L, Biassoni R. Structure of the Ly49 family of natural killer (NK) cell receptors and their interaction with MHC class I molecules. *Immunol Res*. 2004; 30 (1): 95 - 104.

-Dinh QQ, Chong AH. Melanoma in organ transplant recipients: the old enemy finds a new battleground. *Australas J Dermatol*. 2007 Nov; 48 (4):199 - 207.

-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 - 498.

-Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002 Oct 25; 298 (5594): 850 - 854.

-Dumitru CD, Antonysamy MA, Tomai MA, Lipson KE. Potentiation of the anti-tumor effects of imidazoquinoline immune response modifiers by cyclophosphamide. *Cancer Biol Ther*. 2010 Jul; 10 (2): 155 - 165.

-Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3 (11): 991 - 998.

-Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006 Nov; 6 (11): 836 - 848.

-Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 329 - 360.

-Eberhard Y, Gronda M, Hurren R, Datti A, MacLean N, Ketela T, *et al.* Inhibition of SREBP1 sensitizes cells to death ligands. *Oncotarget.* 2011 Mar; 2 (3): 186 - 196.

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

-Erdei E, Torres SM. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010 Nov; 10 (11): 1811 - 1823.

-Erickson CA. From the crest to the periphery: control of pigment cell migration and lineage segregation. *Pigment Cell Res.* 1993 Oct; 6 (5): 336 - 347.

-Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Dec; 4 (12): 1206 - 1212.

-Falo LD Jr, Benacerraf B, Rothstein L, Rock KL. Cerulenin is a potent inhibitor of antigen processing by antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1987 Dec 15; 139(12): 3918 - 3923.

-Fan Z, Zhang Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cell Mol Immunol.* 2005 Aug; 2 (4): 259 - 264.

-Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 2006 May; 20 (3): 123 - 137. Review.

-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.

-Ferlazzo G, Münz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004 Feb 1; 172 (3): 1333 - 1339. Review.

-Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med.* 1999 Apr; 5 (4): 405 - 411.

-Fidler IJ. Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001 Apr; 10 (2): 257 - 269. Review.

-Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, *et al.* Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol.* 2007 Jun 20; 25 (18): 2546 - 2553.

-Flavin R, Zadra G, Loda M. Metabolic alterations and targeted therapies in prostate cancer. *J Pathol.* 2011 Jan; 223 (2): 283 - 294. Review.

-Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, *et al.* Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 2009 Sep 8; 16 (3): 183 - 194.

-Fujimura T, Mahnke K, Enk AH. Myeloid derived suppressor cells and their role in tolerance induction in cancer. *J Dermatol Sci.* 2010 Jul; 59 (1): 1 - 6.

-Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, *et al.* Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res.* 2008; 68; 1003 -1011.

-Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res* 1997; 17 (6D): 4589 - 4593.

-Gamberale R, Galmarini CM, Fernandez-Calotti P, Jordheim L, Sánchez-Avalos J, Dumontet C, *et al.* In vitro susceptibility of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets to fludarabine. *Biochem Pharmacol.* 2003 Dec 1; 66 (11): 2185 - 2191.

-Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer.* 2005 Jan; 41 (1): 28 - 44. Review.

-Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun; 10 (6): 453 - 460.

-Germeau C, Ma W, Schiavetti F, *et al.* High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J Exp Med.* 2005; 201: 241 - 248.

-Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med.* 2002; 195: 327 - 333.

-Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Dec; 11 (12): 1513 - 1530.

-Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ, Lechpammer M, Huesken D, Zimmermann J, Signoretti S, Loda M. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell.* 2004; 5: 253 - 261.

-Granucci F, Zanoni I, Feau S, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 2003 Jun 2; 22 (11): 2546 - 2551.

-Graziani G, Tentori L, Navarra P. Ipilimumab: A novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmacol Res.* 2012 Jan; 65 (1): 9 - 22.

-Gregory AD, Houghton AM. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 2011 Apr 1; 71 (7): 2411 - 2416.

-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. [Epub ahead of print]

-Hamdy S, Haddadi A, Hung RW, Lavasanifar A. Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011 Sep 10; 63 (10 - 11): 943 - 955.

-Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2005 Feb; 17 (1): 29 - 35.

-Hanlon DJ, Aldo PB, Devine L, Alvero AB, Engberg AK, Edelson R, *et al.* Enhanced stimulation of anti-ovarian cancer CD8(+) T cells by dendritic cells loaded with nanoparticle encapsulated tumor antigen. *Am J Reprod Immunol.* 2011 Jun; 65 (6): 597 - 609.

-Hannun YA, Obeid LM. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem.* 2002; 277 (29): 25847-25850.

-Hazlett L, Wu M. Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res.* 2011 Jan; 343 (1): 175 - 188.

-Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest.* 2002; 109: 409 - 417.

-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 - 987.

-Hirschhorn-Cymerman D, Rizzuto GA, Merghoub T, Cohen AD, Avogadri F, Lesokhin AM, *et al.* OX40 engagement and chemotherapy combination provides potent antitumor immunity with concomitant regulatory T cell apoptosis. *J Exp Med.* 2009 May 11; 206 (5): 1103 - 1116.

-Ho TS, Ho YP, Wong WY, Chi-Ming Chiu L, Wong YS, Eng-Choon Ooi V. Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother.* 2007 Oct; 61 (9): 578 - 587.

-Hoover RG, Gullickson G, Kornbluth J. Impaired NK cytolytic activity and enhanced tumor growth in NK lytic-associated molecule-deficient mice. *J Immunol.* 2009 Dec 1; 183 (11): 6913 - 6921.

-Horiguchi A, Asano T, Asano T, Ito K, Sumitomo M, Hayakawa M. Fatty acid synthase over expression is an indicator of tumor aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. *J Urol.* 2008a. Sep; 180 (3): 1137 - 1140.

-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.* 2008b. Aug; 180 (2): 729 - 736.

-Hoves S, Trapani JA, Voskoboinik I. The battlefield of perforin / granzyme cell death pathways. *J Leukoc Biol.* 2010 Feb; 87 (2): 237 - 243.

-Hsu YC, Liou YM. The anti-cancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on the signaling pathways associated with membrane receptors in MCF-7 cells. *J Cell Physiol.* 2011 Oct; 226 (10): 2721 - 2730.

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

-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 – Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2012, disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/> [acessado 2012 Fev. 07].

-Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, *et al.* Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic T cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer.* 1996; 66: 470 - 476.

-Jaiswal S, Chao MP, Majeti R, Weissman IL. Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance. *Trends Immunol.* 2010 Jun; 31 (6): 212 - 219.

-Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197 - 216.

-Jiang Q, Wei H, Tian Z. IFN-producing killer dendritic cells contribute to the inhibitory effect of poly I:C on the progression of murine melanoma. *J Immunother.* 2008 Jul-Aug; 31 (6): 555 - 562.

-Jilaveanu LB, Aziz SA, Kluger HM. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work? *Clin Dermatol.* 2009 Nov - Dec; 27 (6): 614 - 625.

-Jin YJ, Li SZ, Zhao ZS, An JJ, Kim RY, Kim YM, Baik JH, Lim SK. Carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) activity stimulation by cerulenin via sympathetic nervous system activation overrides cerulenin's peripheral effect. *Endocrinology.* 2004 Jul; 145 (7): 3197 - 3204.

-Jochen AL, Hays J, Mick G. Inhibitory effects of cerulenin on protein palmitoylation and insulin internalization in rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Oct 26; 1259 (1): 65 - 72.

-Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, *et al*. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*. 1994 May 5; 369 (6475): 31 - 37.

-Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 2011 Dec; 30 (4): 222 - 228.

-Kapur P, Rakheja D, Roy LC, Hoang MP. Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. *Mod Pathol*. 2005. Aug; 18 (8): 1107 - 1112.

-Karlhofer FM, Ribaldo RK, Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49⁺ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 1992 Jul 2; 358 (6381): 66 - 70.

-Kerr EH, Hameed O, Lewis JS Jr, Bartolucci AA, Wang D, Said-Al-Naief N. Head and Neck Mucosal Malignant Melanoma: Clinicopathologic Correlation With Contemporary Review of Prognostic Indicators. *Int J Surg Pathol*. 2011 Aug 23. [Epub ahead of print]

-Kholmanskikh O, van Baren N, Brasseur F, Ottaviani S, Vanacker J, Arts N, van der Bruggen P, Coulie P, De Plaen E. Interleukins 1alpha and 1beta secreted by some melanoma cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens. *Int J Cancer*. 2010 Jan 22. [Epub ahead of print]

-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.

-Kim J, Mooney DJ. In Vivo Modulation of Dendritic Cells by Engineered Materials: Towards New Cancer Vaccines. *Nano Today.* 2011 Oct; 6 (5): 466 - 477.

-Kim KD, Choi SC, Kim A, Choe YK, Choe IS, Lim JS. Dendritic cell-tumor coculturing vaccine can induce antitumor immunity through both NK and CTL interaction. *Int Immunopharmacol.* 2001 Nov; 1 (12): 2117 - 2129.

-Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 12099 - 12104.

-King M, Spooner D, Rowlands DC. Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma of the parotid gland and neck lymph nodes: a case report and a review of the literature. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2001; 13 (6): 466 - 469.

-Kirkwood JM, Moschos S, Wang W. Strategies for the development of more effective adjuvant therapy of melanoma: current and future explorations of antibodies, cytokines, vaccines, and combinations. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 1; 12 (7 Pt 2): 2331s - 2336s. Review.

-Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem* 2004; 279 (29): 30540 - 30545.

-Knowles LM, Yang C, Osterman A, Smith JW. Inhibition of fatty-acid synthase induces caspase-8-mediated tumor cell apoptosis by up-regulating DDIT4. *J Biol Chem.* 2008 Nov 14; 283 (46): 31378 - 31384.

-Ko YH, Park S, Jin H, Woo H, Lee H, Park C, Kim K. Granzyme B leakage-induced apoptosis is a crucial mechanism of cell death in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Lab Invest.* 2007 Mar; 87 (3): 241 - 250.

-Koh CY, Blazar BR, George T, Welniak LA, Capitini CM, Raziuddin A, *et al.* Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. *Blood.* 2001 May 15; 97 (10): 3132 - 3137.

-Konjevic G, Mirjacić Martinović K, Jurisić V, Babović N, Spuzić I. Biomarkers of suppressed natural killer (NK) cell function in metastatic melanoma: decreased NKG2D and increased CD158a receptors on CD3-CD16+ NK cells. *Biomarkers.* 2009 Jun; 14 (4): 258 - 270.

-Kontani K, Sawai S, Hanaoka J, Tezuka N, Inoue S, Fujino S. Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers. *Eur J Surg Oncol.* 2001 Mar; 27 (2): 180 - 186.

-Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease - a review. Part 2: Fatty Acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Sep; 155 (3): 195 - 218.

-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 - 2075.

-Krishnamachari Y, Geary SM, Lemke CD, Salem AK. Nanoparticle delivery systems in cancer vaccines. *Pharm Res.* 2011 Feb; 28 (2): 215 - 236.

-Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE *et al.* Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; 21 (4): 325 - 329.

-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 - 3454.

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

-Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Eisher SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Research* 2003; 63 (1): 132 - 139.

-Kurts C. Cross-presentation: inducing CD8 T cell immunity and tolerance. *J Mol Med (Berl)*. 2000; 78 (6): 326 - 332.

-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.

-Lake RA, Robinson BW. Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5 (5): 397 - 405.

-Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, *et al.* NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 2009 May; 119 (5): 1251 - 1263.

-Lancelin W, Guerrero-Plata A. Isolation of mouse lung dendritic cells. *J Vis Exp*. 2011 Nov 22; (57). pii: 3563.

- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 225 - 274.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol*. 2001 Jun; 13 (3): 291 - 298. Review.
- Larmonier N, Fraszczak J, Lakomy D, Bonnotte B, Katsanis E. Review: Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 59: 1 - 11.
- Le Boit PE, Burg G, Weedon D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours, Lyon: IARC Press. 2006: 84 - 86.
- Lee JS, Lee MS, Oh WK, Sul JY. Fatty acid synthase inhibition by amentoflavone induces apoptosis and antiproliferation in human breast cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2009 Aug; 32 (8): 1427 - 1432.
- Lee SC, Srivastava RM, López-Albaitero A, Ferrone S, Ferris RL. Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunol Res*. 2011 Aug; 50 (2-3): 248 - 254. Review.
- Lee SK, Gasser S. The role of natural killer cells in cancer therapy. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010 Jan 1; 2: 380 - 391.
- 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 - 384. Chinese.

-Li JN, Gorospe M, Cherst FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WH *et al.* Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Research* 2001; 61 (4): 1493 - 1499.

-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.

-Liu B, Wang Y, Fillgrove KL, Anderson VE. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002 Mar; 49 (3): 187 - 193.

-Liu H, Liu Y, Zhang JT. A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction. *Mol Cancer Ther.* 2008 Feb; 7 (2): 263 - 270.

-Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science.* 2000; 288 (5475): 2379 - 2381.

-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 - 493.

-Lv HF, Cui F, Yu CH, Deng LL, Ji JJ, Lu D, *et al.* Inhibition of lung metastasis in mice by intravascular injection of dendritic cells and natural killer cells. *Biotechnol Lett.* 2009 Nov; 31 (11): 1709 - 1715.

-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.

-Maddodi N, Setaluri V. Role of UV in cutaneous melanoma. *Photoch Photobio* 2008, 84: 528 - 536. Review.

-Magee T, Seabra MC. Fatty acylation and prenylation of proteins: what's hot in fat. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Apr; 17 (2): 190 - 196.

-Makrigiannis AP, Pau AT, Schwartzberg PL, McVicar DW, Beck TW, Anderson SK. A BAC contig map of the Ly49 gene cluster in 129 mice reveals extensive differences in gene content relative to C57/BL6 mice. *Genomics*. 2002 Mar; 79 (3): 437 - 444.

-Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002 Nov; 23 (11): 549 - 555. Review.

-Mantovani A. The growing diversity and spectrum of action of myeloid-derived suppressor cells. *Eur J Immunol*. 2010 Dec; 40 (12): 3317 - 3320.

-Mantovani A. The yin-yang of tumor-associated neutrophils. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8; 16 (3): 173 - 174.

-Martel PM, Bingham CM, McGraw CJ, Baker CL, Morganelli PM, Meng ML, Armstrong JM, Moncur JT, Kinlaw WB. S14 protein in breast cancer cells: direct evidence of regulation by SREBP-1c, superinduction with progestin, and effects on cell growth. *Exp Cell Res*. 2006; 312: 278 - 288.

-Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2009 May 5; 100 (9):1369 - 1372.

-Matsuoka H, Tsubaki M, Yamazoe Y, Ogaki M, Satou T, Itoh T, *et al*. Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways. *Exp Cell Res*. 2009 Jul 15; 315 (12): 2022 - 2032.

-McKay K, Moore PC, Smoller BR, Hiatt KM. Association between natural killer cells and regression in melanocytic lesions. *Hum Pathol*. 2011 Dec; 42 (12): 1960 - 1964.

-McQueen KL, Freeman JD, Takei F, Mager DL. Localization of five new Ly49 genes, including three closely related to Ly49c. *Immunogenetics*. 1998 Aug; 48 (3): 174 - 183.

-Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000 Aug 3; 343 (5): 338 - 344.

-Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G, *et al*. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Apr 1;101(7): 519 - 532.

-Meinzel T, Giglione C. Protein lipidation meets proteomics. *Front Biosci*. 2008 May 1; 13: 6326 - 6340. Review.

-Meleti M, Leemans CR, Mooi WJ, Vescovi P, van der Waal I. Oral malignant melanoma: a review of the literature. *Oral Oncol*. 2007 Feb; 43 (2): 116 - 121. Review.

-Mempel TR, Bauer CA. Intravital imaging of CD8+ T cell function in cancer. Clin Exp Metastasis. 2009; 26 (4): 311 - 327.

-Menendez JA, Colomer R, Lupu R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity enhances vinorelbine (Navelbine) - induced cytotoxicity and apoptotic cell death in human breast cancer cells. Oncol Rep. 2004a Aug; 12 (2): 411 - 422.

-Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer. 2007 Oct; 7 (10): 763 - 777. Review.

-Menendez JA, Oza BP, Atlas E, Verma VA, Mehmi I, Lupu R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity antagonizes estradiol- and tamoxifen-induced agonist transactivation of estrogen receptor (ER) in human endometrial adenocarcinoma cells. Oncogene. 2004b Jun 17; 23 (28): 4945 - 4958.

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

-Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (XenicalTM) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. Ann Oncol. 2005b Aug; 16 (8): 1253 - 1267.

-Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Roper S, Colomer R, *et al.* Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. Proc Nac Acad Sci USA 2004c; 101(29): 10715 - 10720.

-Menzies SW, McCarthy WH. Complete regression of primary cutaneous malignant melanoma. *Arch Surg*. 1997 May; 132 (5): 553 - 556.

-Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med*. 1990 May 1; 171 (5): 1753 - 1771.

-Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006 Jul 6; 355 (1): 51 - 65.

-Mittendorf EA, Storrer CE, Shriver CD, *et al*: Investigating the combination of trastuzumab and HER2/neu peptide vaccines for the treatment of breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2006; 13:1085 - 1098.

-Moan J, Porojnicu AC, Dahlback A. Ultraviolet radiation and malignant melanoma. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 624: 104 - 116.

-Morello S, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Maiolino P, Ngkelo A, *et al*. NK1.1 cells and CD8 T cells mediate the antitumor activity of CI-IB-MECA in a mouse melanoma model. *Neoplasia*. 2011 Apr; 13 (4): 365 - 373.

-Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, *et al*. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol*. 2006; 18: 151 - 158.

-Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, *et al*. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev*. 2006 Dec; 214: 219 - 228.

-Morton DL, Essner R, Kirkwood JM., Wollman RC. Malignant melanoma. In: Holland JF, Frei E, Bast RC Jr, Pollock RE, Kufe DW, Weichselbaum RR, editors. Cancer medicine. 6th ed. Ontario: Decker Inc 2003. p. 2467 - 2499.

-Murata S, Yanagisawa K, Fukunaga K, Oda T, Kobayashi A, Sasaki R, *et al.* Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci.* 2010 Aug; 101 (8): 1861 - 1865.

-Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola FM, Letsch A, Keilholz U. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Oct 1; 9 (12): 4296 - 4303.

-Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, *et al.* Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol.* 2007 Nov; 8 (11): 1217 - 1226.

-Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, *et al.* CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Aug 15; 58 (16): 3491 - 3494.

-Nardin A, Wong WC, Tow C, Molina TJ, Tissier F, Audebourg A, *et al.* Dacarbazine promotes stromal remodeling and lymphocyte infiltration in cutaneous melanoma lesions. *J Invest Dermatol.* 2011 Sep; 131 (9): 1896 - 1905.

-Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzul T *et al.* Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology.* 2001; 69 (6): 297 - 303.

-Nierkens S, den Brok MH, Garcia Z, Togher S, Wagenaars J, Wassink M, *et al.* Immune adjuvant efficacy of CpG oligonucleotide in cancer treatment is founded

specifically upon TLR9 function in plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Res.* 2011 Oct 15; 71 (20):6428 - 6437.

-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 - 1250.

-Oikarinen A, Raitio A. Melanoma and other skin cancers in circumpolar areas. *Int J Circumpolar Health.* 2000 Jan; 59 (1): 52 - 56.

-Okawa Y, Hideshima T, Ikeda H, Raje N, Vallet S, Kiziltepe T, *et al.* Fatty acid synthase is a novel therapeutic target in multiple myeloma *British Journal of Haematology.* 2008 Jan; 141: 659 - 671.

-Oliveira IO, Almeida HL Jr. Current knowledge on the biology of melanocytes in the human hair follicle. *An Bras Dermatol.* 2003 May/Jun; 78 (3): 331 - 343.

-Omura S. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Am Soc Microbiol* 1976; 3 (40): 681 - 697.

-Orihuela M, Margulies DH, Yokoyama WM. The natural killer cell receptor Ly-49A recognizes a peptide-induced conformational determinant on its major histocompatibility complex class I ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15; 93 (21): 11792 - 11797.

-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 - 554.

- Ortaldo JR, Mason AT, Winkler-Pickett R, Raziuddin A, Murphy WJ, Mason LH. Ly-49 receptor expression and functional analysis in multiple mouse strains. *J Leukoc Biol.* 1999 Sep; 66 (3): 512 - 520.
- Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Feb; 18 (1): 11 - 18. Epub 2008 Mar 4. Review.
- Palermo B, Del Bello D, Sottini A, Serana F, Ghidini C, Gualtieri N, *et al.* Dacarbazine treatment before peptide vaccination enlarges T-cell repertoire diversity of melan-a-specific, tumor-reactive CTL in melanoma patients. *Cancer Res.* 2010 Sep 15; 70 (18): 7084 - 7092.
- Pandolfi F, Cianci R, Pagliari D, Casciano F, Bagalà C, Astone A, *et al.* The immune response to tumors as a tool toward immunotherapy. *Clin Dev Immunol.* 2011; 2011: 894704. Epub 2011 Dec 5.
- Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res.* 2011 Oct 1; 17 (19): 6287 - 6297.
- Parmiani G. Melanoma antigens and their recognition by T cells. *Keio J Med.* 2001; 50 (2): 86-90. Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J Clin Oncol.* 2008 Feb 1; 26 (4): 626 - 632.

-Pho L, Grossman D, Leachman SA. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr Opin Oncol*. 2006 Mar; 18 (2): 173 - 179.

-Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 Jul 26. [Epub ahead of print]

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

-Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Research* 1998a; 58: 4611 - 4615.

-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 - 2747.

-Pizer ES, Lax SF, Kuhajda FP, Pasternack GR, Kurman RJ. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer*. 1998b Aug 1; 83 (3): 528 - 537.

-Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA, Kuhajda FP. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res*. 2000 Jan 15; 60 (2): 213 - 218.

-Prasad ML, Patel S, Hoshaw-Woodard S, Escrig M, Shah JP, Huvos AG, *et al.* Prognostic factors for malignant melanoma of the squamous mucosa of the head and neck. *Am J Surg Pathol.* 2002 Jul; 26 (7): 883 - 892.

-Puig T, Relat J, Marrero PF, Haro D, Brunet J, Colomer R. Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals. *Anticancer Res.* 2008 Nov-Dec; 28 (6A): 3671 - 3676.

-Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, Hunter T, Cho HI, Antonia S, Altiook S, Celis E, Gabilovich DI. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest.* 2010 Apr 1; 120 (4): 1111 - 1124.

-Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, *et al.* Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol.* 1997 Jan; 150 (1): 201 - 208.

-Riker AI, Zea N, Trinh T. The epidemiology, prevention, and detection of melanoma. *Ochsner J.* 2010 Summer; 10 (2): 56 - 65.

-Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M D JW, Garbe C, *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2011 Jun 30; 364 (26): 2517 - 2526.

-Robson NC, Hoves S, Maraskovsky E, Schnurr M. Presentation of tumour antigens by dendritic cells and challenges faced. *Curr Opin Immunol.* 2010 Feb; 22 (1): 137 - 144.

-Rolinski J, Hus I. Dendritic-cell tumor vaccines. *Transplant Proc.* 2010 Oct; 42 (8): 3306 - 3308.

-Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr; 21 (2): 233 - 240.

-Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004 Sep; 10 (9): 909 - 915.

-Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature.* 2001 May 17; 411 (6835): 380 - 384.

-Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Molecular Cancer Research.* 2003, v. 1, n. 10, p. 707 - 715.

-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 - 375.

-Santomasso BD, Roberts WK, Thomas A, Williams T, Blachère NE, Dudley ME, *et al.* A T-cell receptor associated with naturally occurring human tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 27; 104 (48): 19073 - 19078.

-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 - 105.

-Seeger JM, Schmidt P, Brinkmann K, Hombach AA, Coutelle O, Zigrino P, *et al.* The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes melanoma cells toward adoptive CTL attack. *Cancer Res.* 2010 Mar 1; 70 (5): 1825 - 1834.

-Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood.* 2005; 106: 609 - 616.

-Shackleton M, Quintana E. Progress in understanding melanoma propagation. *Mol Oncol.* 2010 Oct; 4 (5): 451 - 457.

-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 - 409.

-Shen ZY, Liu W, Bao ZX, Zhou ZT, Wang LZ. Oral melanotic macule and primary oral malignant melanoma: epidemiology, location involved, and clinical implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Jul; 112 (1): e21 - 25.

-Shindo M, Yoshida Y. Regulatory T cells and skin tumors. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2010 Nov; 4(3): 249 - 254.

-Shresta S, Heusel JW, Macivor DM, Wesselschmidt RL, Russell JH, Ley TJ. Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. *Immunol Rev.* 1995 Aug; 146: 211 - 221.

-Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS. Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. *Hum Pathol.* 1996 Sep; 27 (9): 917 - 921.

-Shurbaji MS, Kuhajda FP, Pasternack GR, Thurmond TS. Expression of oncogenic antigen 519 (OA-519) in prostate cancer is a potential prognostic indicator. *Am J Clin Pathol.* 1992 May; 97 (5): 686 - 691.

-Shurin GV, Ouellette CE, Shurin MR. Regulatory dendritic cells in the tumor immunoenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Feb; 61 (2): 223 - 230.

-Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol.* 2009 Jul 1; 183 (1): 137 - 144.

-Shurin MR, Shurin GV, Lokshin A, Yurkovetsky ZR, Gutkin DW, Chatta G, *et al.* Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Sep; 25 (3): 333 - 356.

-Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 2008 Oct; 18 (5): 349 - 355. Review.

-Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer.* 2006 Apr; 42 (6): 717 - 727.

-Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA *et al.* Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncology* 2004; 40: 688 - 696.

-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 - 139.

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

-Situm M, Buljan M, Bulić SO, Simić D. The mechanisms of UV radiation in the development of malignant melanoma. *Coll Antropol*. 2007 Jan; 31 Suppl 1: 13 - 16.

-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, Thia KY, Cretney E, Kelly JM, Snook MB, Forbes CA, *et al*. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol*. 1999 Jun 1; 162 (11): 6658 - 6662.

-Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 2003 May 19; 22 (20): 3138 - 3151.

-Solomon CC, White E, Kristal AR, Vaughan T. Melanoma and lifetime UV radiation. *Cancer Causes Control*. 2004 Nov; 15 (9): 893 - 902.

-Sotomayor EM, Borrello I, Levitsky HI. Tolerance and cancer: a critical issue in tumor immunology. *Crit Rev Oncog*. 1996; 7 (5 - 6): 433 - 456.

-Soudja SM, Henri S, Mello M, Chasson L, Mas A, Wehbe M, *et al*. Disrupted lymph node and splenic stroma in mice with induced inflammatory melanomas is associated with impaired recruitment of T and dendritic cells. *PLoS One*. 2011; 6 (7): e22639.

-Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008; 111: 1327 – 1333.

-Spagnolo F, Caltabiano G, Queirolo P. Uveal melanoma. *Cancer Treat Rev*. 2012 Jan 21. [Epub ahead of print]

-Stein JA, Brownell I. Treatment approaches for advanced cutaneous melanoma. *J Drugs Dermatol*. 2008 Feb; 7 (2): 175 - 179.

-Stojanovic A, Cerwenka A. Natural killer cells and solid tumors. *J Innate Immun*. 2011; 3 (4): 355 - 364.

-Su PJ, Chen JS, Liaw CC, Chang HK, Wang HM, Yang TS, *et al*. Biochemotherapy with carmustine, cisplatin, dacarbazine, tamoxifen and low-dose interleukin-2 for patients with metastatic malignant melanoma. *Chang Gung Med J*. 2011 Sep-Oct; 34 (5): 478 - 486.

-Sun W, Schuchter LM. Metastatic melanoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2001 Jun; 2 (3): 193 - 202.

-Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech.* 2001 Oct 15; 55 (2): 92 - 99.

-Swinnen JV, Heemers H, Doboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene* 2000 (19) 5173 - 5181.

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

-Szincsiák N, Hegyesi H, Hunyadi J, Martin G, Lázár-Molnár E, Kovács P, *et al.* Cimetidine and a tamoxifen derivative reduce tumour formation in SCID mice xenotransplanted with a human melanoma cell line. *Melanoma Res.* 2002 Jun; 12 (3): 231 - 240.

-Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol.* 2007 Oct; 7 (10): 790 - 802.

-Taieb J, Chaput N, Ménard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, *et al.* A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med.* 2006 Feb; 12 (2): 214 - 219.

-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 - 2212.

-Tarhini A, Lo E, Minor DR. Releasing the brake on the immune system: ipilimumab in melanoma and other tumors. *Cancer Biother Radiopharm.* 2010 Dec; 25 (6): 601 - 613.

-Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem.* 2002 Nov 15; 277 (46): 44507- 44512.

-Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, Chaput N, Zitvogel L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol.* 2008 May; 9 (5): 486 - 494.

-Thiery J, Keefe D, Boulant S, Boucrot E, Walch M, Martinvalet D, *et al.* Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol.* 2011 Jun 19; 12 (8): 770 - 777.

-Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 365: 687 - 701.

-Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285 (2): 217 - 223.

-Thupari, J. N., Landree, L. E., Ronnett, G. V., and Kuhajda, F. P. C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity. *Proc.Natl. Acad Sci USA.* 2002; 99: 9498 - 9502.

-Tisch R. Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation. *Int Rev Immunol.* 2010 Apr; 29 (2): 111 - 118.

-Torrezini T, Athanazio DA. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2008; 54: 63 - 77.

-Trobe J, Beebe TM, Buell JF. Posttransplant malignancy. *Prog Transplant*. 2004; 14: 193 - 200.

-Tsuji T, Yoshinaga M, Togami S, Douchi T, Nagata Y. Fatty acid synthase expression and clinicopathological findings in endometrial cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004 Jun; 83 (6): 586 - 590.

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

-Turcotte S, Rosenberg SA. Immunotherapy for metastatic solid cancers. *Adv Surg*. 2011; 45: 341 - 360.

-Tvrzická E, Stanková B, Vecka M, Zák A. Fatty acids--2. Clinical and physiological significance. *Cas Lek Cesk*. 2009; 148 (3): 116 - 123.

-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 - 1255.

-Udoji F, Martin T, Etherton R, Whalen MM. Immunosuppressive effects of triclosan, nonylphenol, and DDT on human natural killer cells in vitro. *J Immunotoxicol*. 2010 Jul-Sep; 7 (3): 205 - 212.

-Ueda SM, Mao TL, Kuhajda FP, Vasoontara C, Giuntoli RL, Bristow RE, Kurman RJ, Shih IeM. Trophoblastic neoplasms express fatty acid synthase, which may be a therapeutic target via its inhibitor C93. *Am J Pathol.* 2009 Dec; 175 (6): 2618 - 2624.

-Ueda SM, Yap KL, Davidson B, Tian Y, Murthy V, Wang TL, Visvanathan K, Kuhajda FP, Bristow RE, Zhang H, Shih IeM. Expression of Fatty Acid Synthase Depends on NAC1 and Is Associated with Recurrent Ovarian Serous Carcinomas. *J Oncol.* 2010; 175 (6): 2618 - 2624.

-Ueha S, Shand FH, Matsushima K. Myeloid cell population dynamics in healthy and tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol.* 2011 Jul; 11(7): 783 - 788.

-Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspod C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev.* 2007; 219: 118 - 142.

-Umansky V, Sevko A. Overcoming immunosuppression in the melanoma microenvironment induced by chronic inflammation. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Feb; 61 (2): 275 - 282.

-Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003 Oct; 9 (10): 1269 - 1274.

-Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003; 9: 1269 - 1274.

-van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, *et al.* Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1996 Nov 1; 184 (5): 1781 - 1790.

-van der Most RG, Currie AJ, Cleaver AL, Salmons J, Nowak AK, van der Most RG, Currie AJ, Cleaver AL, Salmons J, Nowak AK, Mahendran S, Larma I, Prosser A, Robinson BW, Smyth MJ, Scalzo AA, Degli-Esposti MA, Lake RA. Cyclophosphamide Chemotherapy Sensitizes Tumor Cells to TRAIL dependent CD8 T cell-mediated immune attack resulting in suppression of tumor growth. *PLoS ONE.* 2009; 4 (9): e6982.

-Vento S, Cainelli F, Temesgen Z. Lung infections after cancer chemotherapy. *Lancet Oncol.* 2008 Oct; 9 (10): 982 - 992.

-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 - 4173.

-Visca, P.; Sebastiani, V.; Pizer, E. S.; Botti, C.; De Carli, P.; Filippi, S.; *et al.* Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23 (1A): 335 - 339.

-Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008 May; 9 (5): 503 - 510.

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

-Vremec D. The isolation of mouse dendritic cells from lymphoid tissues and the identification of dendritic cell subtypes by multiparameter flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2010; 595: 205 - 229.

-Vujanovic NL in *Measuring immunity: basic biology and clinical assessment*. Section I: Fundamentals of the Immune Response, Testing Natural Killer Cells. Edited by Michael T. Lotze; Angus W. Thomson. Elsevier Ltd. 2005; 34: 396 - 403.

-Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood.* 2005 Oct 1; 106 (7): 2252 - 2258.

-Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene.* 2005 May 19; 24 (22): 3574 - 3582.

-Wang X, Lin J, Chen Y, Zhong W, Zhao G, Liu H, Li S, Wang L, Li S. Novel fatty acid synthase (FAS) inhibitors: design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies. *Bioorg Med Chem.* 2009 Mar 1; 17 (5):1898 - 1904.

-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 - 447.

-Wang X, Tian W. Green Tea Epigallocatechin Gallate: A natural inhibitor of fatty-acid synthase. *Biochl Bioph Res Comm.* 2001b; 288: 1200 - 1206.

-Wang Y, Kuhajda FP, Li JN, Pizer ES, Han WF, *et al.* Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell cultures supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett.* 2001a; 167 (1): 99 - 104.

-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 - 273.

-Weller PF, Ackerman SJ, Nicholson-Weller A, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol.* 1989 Nov; 135 (5): 947 - 959.

-Welte S, Kuttruff S, Waldhauer I, Steinle A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol.* 2006; 7: 1334 - 1342.

-Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 2008 Oct 6; 27 (45): 5904 - 5912. Review.

-Wilhelm BT, Gagnier L, Mager DL. Sequence analysis of the Iy49 cluster in C57/BL6 mice: a rapidly evolving multigene family in the immune system. *Genomics.* 2002 Dec; 80 (6): 646 - 661.

-Williams P, Bouchentouf M, Rafei M, Romieu-Mourez R, Hsieh J, Boivin MN, *et al.* A dendritic cell population generated by a fusion of GM-CSF and IL-21 induces tumor-antigen-specific immunity. *J Immunol.* 2010 Dec 15; 185 (12): 7358 - 7366.

-Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, *et al.* Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med.* 1997 Jan 20; 185 (2): 317 - 328.

-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 - 3025.

-Wortman MD, Clegg DJ, D'Alessio D, Woods SC, Seeley RJ. C75 inhibits food intake by increasing CNS glucose metabolism. *Nat Med*. 2003; 9(5): 483 - 485.

-Xu D, Gu P, Pan PY, Li Q, Sato AI, Chen SH. NK and CD8 T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1bb costimulation. *Int. J. Cancer*. 2004; 109: 499 - 506.

-Yang N, Kays JS, Skillman TR, Burris L, Seng TW, Hammond C. C75 [4-methylene-2-octyl-5-oxo-tetrahydro-furan-3-carboxylic acid] activates carnitine palmitoyltransferase-1 in isolated mitochondria and intact cells without displacement of bound malonyl CoA. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Jan; 312 (1): 127 - 133.

-Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 405 - 429.

-Yokoyama WM, Plougastel BF. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr; 3 (4): 304 - 316.

-Yu JS, Kim AK. Effect of combination of taurine and azelaic acid on antimelanogenesis in murine melanoma cells. *J Biomed Sci*. 2010 Aug 24; 17 Suppl 1: S45.

-Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci*. 2011; 7 (5): 651 - 658.

-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 - 240.

-Zeng L, Wu GZ, Goh KJ, Lee YM, Ng CC, You AB, Wang J, Jia D, Hao A, Yu Q, Li B. Saturated fatty acids modulate cell response to DNA damage: implication for their role in tumorigenesis. *PLoS One.* 2008 Jun 4; 3(6): 2008 Jun 4; 3 (6): e2329.

-Zhan Y, Ginanni N, Tota MR, Wu M, Bays NW, Richon VM, *et al.* Control of cell growth and survival by enzymes of the fatty acid synthesis pathway in HCT-116 colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2008 Sep 15; 14 (18): 5735 - 5742.

-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 - 1696.

-Zhang L, Dermawan K, Jin M, Liu R, Zheng H, Xu L, *et al.* Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin Immunol.* 2008 Nov; 129 (2): 219 - 229.

-Zhang Z, Helman JI, Li LJ. Lymphangiogenesis, lymphatic endothelial cells and lymphatic metastasis in head and neck cancer: a review of mechanisms. *Int J Oral Sci.* 2010 Mar; 2 (1): 5 - 14.

-Zitvogel L, Kroemer G. Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects. *J Clin Invest.* 2009; 119 (8): 2127 - 2130.

-Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 715 - 727.

-Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev. Immunol.* 2006; 6: 295 - 307.



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2150-1, sobre "Avaliação do efeito do tratamento com orlistat sobre a resposta imune contra melanomas experimentais", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edgard Graner / Luciana Yamamoto de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 03 de maio de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2150-1, entitled "Analysis of the effects of orlistat on the immune response against experimental melanomas", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 3, 2010.

Campinas, 13 de maio de 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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