

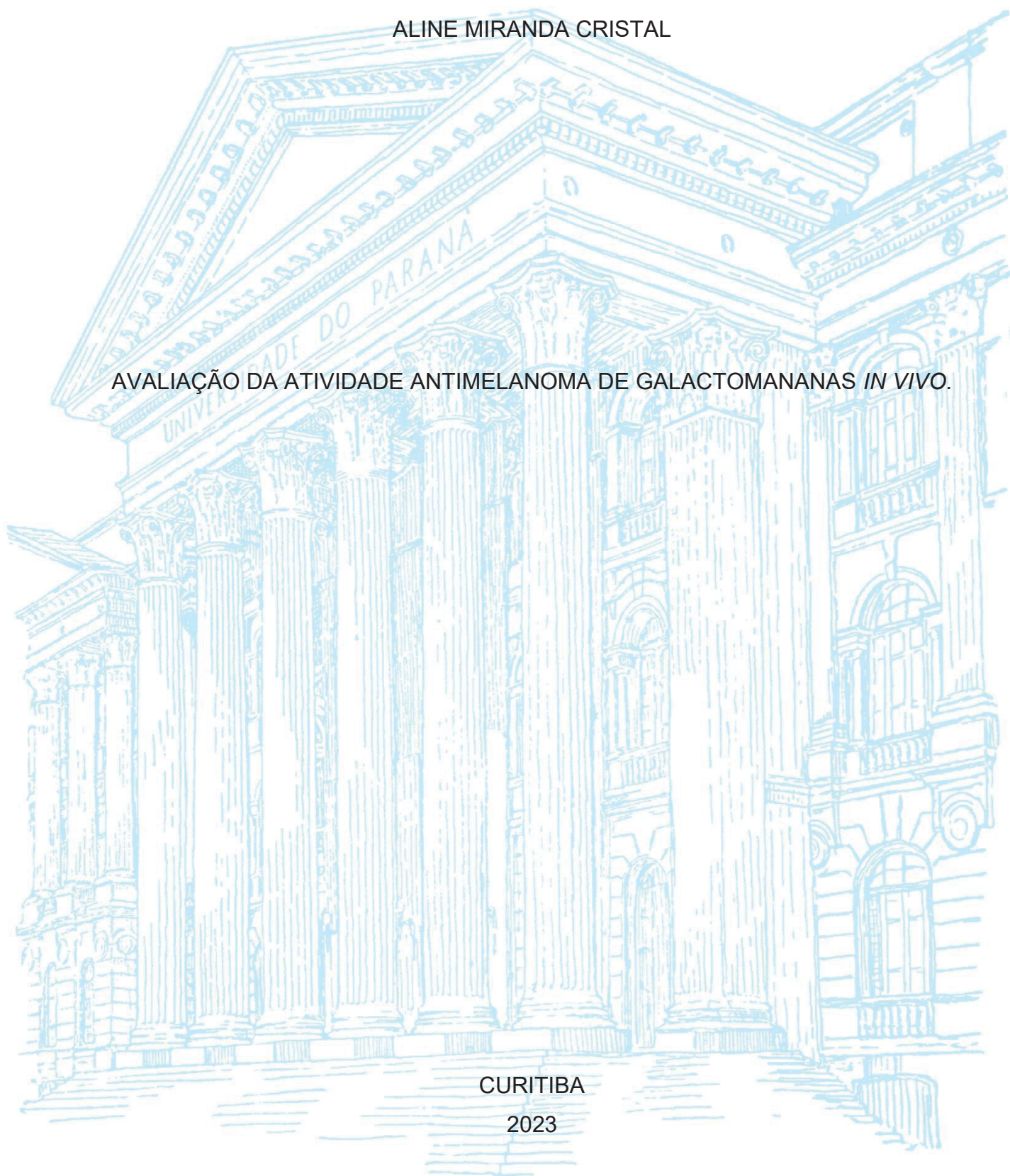
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE MIRANDA CRISTAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE GALACTOMANANAS *IN VIVO*.

CURITIBA

2023



ALINE MIRANDA CRISTAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE GALACTOMANANAS *IN VIVO*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Camargo de Oliveira

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA
PUBLICAÇÃO (CIP)UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Cristal, Aline Miranda.

Avaliação da atividade antimelanoma de galactomananas *in vivo*. / Aline
MirandaCristal. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
CiênciasBiológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Camargo de
Oliveira.

1. Galactomanana. 2. Melanoma. 3. Sistema imune. I. Trindade, Edvaldo da
Silva, 1971-. II. Oliveira, Carolina Camargo de, 1979-. III. Universidade Federal do
Paraná. Setorde Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALINE MIRANDA CRISTAL** intitulada: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE GALACTOMANANAS IN VIVO**, sob orientação do Prof. Dr. EDVALDO DA SILVA TRINDADE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Janeiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

28/03/2023 17:22:27.0

EDVALDO DA SILVA TRINDADE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 17:56:18.0

TÁRCIO TEODORO BRAGA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 15:12:23.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 267130

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/validante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 267130

Dedico essa dissertação a todos os animais de modelo experimental à
pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me sustentou todos os dias com amor, graça e que colocou em mim a paixão pelo estudo da vida. À Jesus por me trazer esperança em situações difíceis. Ao Espírito Santo consolador, que em momentos de angústia me trouxe paz.

Já muito antes de ingressar no mestrado sabia que qualquer trabalho científico nunca é feito sozinho. E de fato se não tivesse o auxílio de diversas pessoas em diferentes momentos, esse trabalho jamais teria sido realizado. O auxílio a qual me refiro não foi somente acadêmico ou profissional, mas também das pessoas que me acompanharam em todo o processo, amigos, conhecidos, familiares, apoiando-me nos momentos difíceis ou compreendendo minhas ausências. Tenho certeza de que é muito difícil enumerar todas essas pessoas, mas algumas delas não poderiam deixar de ser citadas. Portanto, um agradecimento especial:

Aos meus pais Antônio Carlos e Nadienka que me guiaram com todo amor e carinho e sempre apoiaram meus sonhos. Por se dedicarem a me proporcionar uma educação de qualidade, que infelizmente ainda não é uma realidade para todos. A minha irmã Tamiris que sempre foi uma inspiração para mim e que me ajudou nesse processo.

A minha família, que sempre me apoiou nos caminhos que escolhi para minha vida. Especialmente ao meu avô Nery, que com todo amor me incentivou aos estudos, mas infelizmente não irá presenciar o final dessa caminhada comigo. A minha tia Ciomara que sempre foi um exemplo e inspiração a seguir na carreira de pesquisa científica.

Ao meu parceiro e companheiro Lucas Fortkamp e a minha filha de quatro patas Atiye, que me deram suporte quando eu precisava e entenderam as minhas ausências.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade que me guiou desde o início a pesquisa, pela confiança a esse projeto e que sempre esteve de prontidão para me ajudar. A minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Carolina Camargo de Oliveira que me incentivou e guiou a realizar esse projeto, além de despertar minha paixão ao estudo do sistema imune no câncer. A Prof.^a Dr.^a Fernanda Fogagnoli Simas que foi grande colaboradora desse trabalho me auxiliando no estudo bioquímico dos compostos desse trabalho, bem como pelo apoio e brilho nos olhos pelo trabalho.

Todos foram de grande importância para esse trabalho e minha caminhada acadêmica.

Aos meus amigos do laboratório, Anderson, Yasmin, Jacqueline, Stelley, Jessica, Stela, Gabriel e Alessandra pela amizade, pelo apoio nos experimentos *in vivo* e pelas conversas divertidas no trabalho.

Aos amigos e tutores científicos que não estão mais presentes no laboratório, mas que contribuíram grandemente a minha caminhada na pesquisa, Daniel Bellan, Jenifer Gonçalves, Gustavo Rossi, Maíra Reis e Açucena Maximo.

A Universidade Federal do Paraná e a todos os seus servidores, técnicos e docentes, que sem eles esse trabalho não seria realizado. Ao biotério do Setor de Ciências Biológicas pelo apoio no período de experimentação *in vivo*. Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) por realizarem os escaneamentos das lâminas, especialmente ao Israel Bini. Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, especialmente para o Olair Carlos Beltrame, que realizou os exames clínicos do experimento *in vivo*. Ao Laboratory of Cancer Drug Resistance pelo auxílio e utilização do citômetro, especialmente a aluna Júlia de Paula Dutra e ao professor Dr. Glaucio Valdameri. A Professora Dr^a. Katya Naliwaiko pelo auxílio com o processamento histológico. A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

(Veronica Shoffstall)

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Dentre os diversos tipos de câncer destaca-se o melanoma, uma vez que é a forma mais agressiva de câncer de pele pois possui alta capacidade metastática e baixa responsividade aos tratamentos convencionais, que além de pouco eficientes, provocam vários efeitos adversos ao paciente. Por essa razão, é interessante a busca por compostos que diminua a atividade invasiva e metastática desse tipo de câncer e que não tragam efeitos que afetam a qualidade de vida do paciente. Dentre esses compostos, os polissacarídeos classificados como galactomananas com efeitos antitumorais já foram e ainda são amplamente encontrados e descritos. Com relação a isso, são descritas atividades antitumorais através da inibição do crescimento tumoral, inibição de angiogênese, indução de apoptose, estimulação do sistema imune, inibição de galectinas e diminuição de capacidade metastática. Nesse trabalho foi utilizado dois polissacarídeos derivados da Goma Guar (*Cyamopsis tetragonoloba*), um parcialmente hidrolisado (GGH) e outro parcialmente hidrolisado e sulfatado (GGHS) para avaliar seu efeito imunomodulador e antimelanoma *in vivo*. Esses dois compostos já apresentaram efeito antimelanoma *in vitro*, diminuindo parâmetros de malignidade em células de melanoma murino B16-F10, como invasão, migração e capacidade clonogênica, sendo assim potenciais agentes terapêuticos para a doença. Além disso GGH é estruturalmente similar ao composto Davanat®, um produto patenteado que tem ação antitumoral e imunológica bem descrita na literatura, e o GGHS apresenta atividade anticoagulante comprovada, que, assim como outros heparinóides, tem potencial para ser utilizado em pacientes oncológicos, de modo a prevenir a trombose associada ao câncer. Face ao exposto, a análise da atividade imunomodulatória e antimelanoma *in vivo* de GGH e GGHS, de forma comparativa a um anticoagulante já utilizado na clínica, a heparina de baixo peso molecular (LMWH) é o principal objetivo do presente estudo. Com relação a atividade imunomodulatória observamos que tanto GGH quanto GGHS (100 µg/m) aumentaram a expressão de marcadores com perfil M1 em macrófagos murinos derivados da medula óssea. Ainda aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio e de IL-6 e TNF em macrófagos murinos derivados do lavado peritoneal. Analisando linfócitos, não foi observado aumento da proliferação dessas células quando expostas aos compostos GGH e GGHS (100 µg/m) *in vitro*, no entanto foi observado aumento de células CD3+ em pulmão metastático de camundongos murinos expostos aos compostos (5 mg/kg). Com relação ao volume tumoral e área de metástase experimental foi observado que apenas GGH reduziu significativamente a progressão tumoral (5 mg/kg) em relação ao grupo controle. Vale ressaltar que nenhum dos compostos apresentou alterações hematológicas e anatômicas significativas que levasse a efeitos adversos significativos ao animal. Por fim, quanto ao estudo comparativo entre GGHS (5 mg/kg) e LMWH (1 mg/kg) não houve nenhuma alteração significativa na progressão tumoral e área de metástase pulmonar. Dessa forma as galactomananas presentes nesse estudo demonstraram efeito imunomodulador e o composto GGH um efeito antitumoral em modelo *in vivo* de melanoma murino. Apesar de apenas GGH apresentar efeito antimelanoma *in vivo*, ambos os compostos têm potencial para serem utilizados como terapia coadjuvante, devido seu efeito no sistema imune.

Palavras-chave: Galactomanana. Melanoma. Sistema imune.

ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of death in the world. Among different types of cancer, melanoma is the most aggressive type of skin cancer, as it has a high metastatic capacity and low responsiveness to conventional treatments, which cause several adverse effects. For this reason, it is interesting to search for compounds that reduce the invasive and metastatic activity of melanoma and that do not bring side effects that intervene in a patient quality of life. Among these compounds, polysaccharides classified as galactomannans with antitumor effects have been and still are widely reported. Regarding, antitumor activities are described by tracking tumor growth, tracking angiogenesis, inducing apoptosis, stimulating the immune system, increasing galectins, and decreasing metastatic capacity. In this work, two polysaccharides derived from Guar Gum (*Cyamopsis tetragonoloba*), one partially hydrolyzed (GGH) and the other partially hydrolyzed and sulfated (GGHS) were used to evaluate their immunomodulatory and anti-melanoma effect *in vivo*. These compounds have already shown an anti-melanoma effect *in vitro*, through the reduction of malignancy's parameters in B16-F10 murine melanoma cells, such as invasion, migration, and clonogenic capacity. In addition, GGH is structurally like Davanat® compound, a patented product that has an antitumor and immunological action well described in the literature, and GGHS has proven anticoagulant activity, which, as other heparinoids, has the potential to be used in cancer patients, to prevent cancer-associated thrombosis. Given the above, an analysis of *in vivo* immunomodulatory and anti-melanoma activity of GGH and GGHS, in a comparative way to an anticoagulant already used in the clinic, low molecular weight heparin (LMWH) is the main objective of this research. Regarding immunomodulatory activity, we observed that both GGH and GGHS (100 µg/mL) increased the expression of M1 markers in murine macrophages. It also increased the production of reactive oxygen species and IL-6 and TNF in murine macrophages. Analyzing lymphocytes, compounds did not alter proliferation profile (100 µg/mL) *in vitro*, however, an increase in CD3+ cells was observed in mice's metastatic lung exposed to GGH and GGHS (5 mg/kg). Regarding tumor volume and experimental metastasis area, it was observed that only GGH significantly interrupted tumor progression (5 mg/kg) compared to the control group. It is noteworthy that none of the compounds showed hematological and anatomical changes that lead to adverse effects on the animal. Finally, regarding the comparative study between GGHS (5 mg/kg) and LMWH (1 mg/kg) there was no significant change in tumor progression and lung metastasis area. Thus, the galactomannans present in this study demonstrated an immunomodulatory effect, and the GGH compound had an antitumor effect on murine melanoma *in vivo*. Although only GGH has an anti-melanoma effect *in vivo*, both compounds have the potential to be used as adjuvant therapy due to their effect on the immune system.

Keywords: Galactomannans. Melanoma. Immune System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microambiente tumoral.....	21
Figura 2: Sistema imune no microambiente tumoral.	24
Figura 3: Estágios do melanoma.....	27
Figura 4: Atividade imunoestimulatória de polissacarídeos no contexto tumoral.	32
Figura 5: Esquema experimental <i>in vivo</i>	39
Figura 6: Esquema experimental de isolamento e polarização de macrófagos da medula óssea.....	42
Figura 7: Proliferação de linfócitos T.	46
Figura 8: Perfil dos macrófagos da medula óssea.	50
Figura 9: Espécies reativas de oxigênio de macrófagos da medula óssea.	52
Figura 10: Citocinas dos macrófagos do lavado peritoneal.	54
Figura 11: Imunofenotipagem e quantificação de citocinas do pulmão.	57
Figura 12: Imunofenotipagem e quantificação de citocinas do tumor.....	59
Figura 13: Volume tumoral e histologia GGHS E GGH.	61
Figura 14: Área de metástase pulmonar e histologia GGHS e GGH.....	62
Figura 15: Comparação de Área de metástase no pulmão com porcentagem de células CD3+.....	64
Figura 16: Volume tumoral e histologia GGHS e LMWH.....	68
Figura 17: Área de metástase pulmonar e histologia GGHS e LMWH.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso dos órgãos <i>in vivo</i> GGHS e GGH.....	62
Tabela 2: Exame de sangue - Análise de parâmetros bioquímicos.....	65
Tabela 3: Exame de sangue - Análise da série eritrocitária.	65
Tabela 4: Exame de sangue – Análise da série leucocitária.	66
Tabela 5: Exame de sangue – Análise da série plaquetária.	66
Tabela 6: Peso dos órgãos <i>in vivo</i> LMWH e GGHS.	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 CÂNCER	19
2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL.....	20
2.3 MELANOMA.....	26
2.3.1 Tratamentos para o melanoma	29
2.3.1.1 Polissacarídeos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 CULTIVO CELULAR E ANIMAIS	35
3.2 COMPOSTOS EM ESTUDO	36
3.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS DE LINHAGEM JURKAT.....	37
3.4 MODELOS DE TUMOR SÓLIDO E METÁSTASE EXPERIMENTAL	37
3.5 ISOLAMENTO DE MACRÓFAGOS DO LAVADO PERITONEAL.....	39
3.6 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO TUMOR E PULMÃO.	40
3.7 ISOLAMENTO E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA ...	40
3.8 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
3.9 ENSAIO DE DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).....	43
3.10 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	44
3.11 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA	44
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS.....	45
4.1 ATIVIDADE PROLIFERATIVA SOBRE LINFÓCITOS <i>IN VITRO</i> DE GGHS E GGH.....	45
4.2 AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA DE MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA DE GGHS E GGHS.....	47
4.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DE MACRÓFAGOS DO LAVADO PERITONEAL GGHS E GGH.....	50

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS DE MACRÓFAGOS DO LAVADO PERITONEAL.....	52
4.5 IMUNOFENOTIPAGEM E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS GGHS E GGH DO PULMÃO DE CAMUNDONGOS COM METÁSTASE EXPERIMENTAL E TUMOR SÓLIDO.....	55
4.6 VOLUME TUMORAL E ÁREA DE METÁSTASE GGHS E GGH.	59
4.7 VOLUME TUMORAL E ÁREA DE MESTÁSTASE PULMONAR GHHS E LMWH... ..	67
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6 CONCLUSÃO	73
7 REFERÊNCIAS.....	74
8 ANEXO.....	85

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças, sendo considerado uma das principais causas de morte precoce em 73,2% dos países analisados pela World Health Organization, conforme o seu levantamento divulgado em 2020 (C; WEIDERPASS; STEWART, 2020). Nesse mesmo ano foram estimados mais de 18 milhões de casos e 10 milhões de mortes por câncer no mundo (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil houve um total de mais de 225 mil casos de morte por neoplasias em 2020, e entre janeiro e julho de 2020 foram diagnosticados 180 mil novos casos de câncer (INCA, 2020).

Os tumores não são formados apenas por células neoplásicas. Outras células recrutadas para o local e um complexo de moléculas também compõe os tumores criando o microambiente tumoral. Dentre os constituintes desse microambiente, o sistema imunológico apresenta um papel importante e complexo. Assim a dinâmica desse componente tumoral ao longo da progressão da doença se divide em três fases bem determinadas: a eliminação, o equilíbrio e a fuga. Os macrófagos e linfócitos T citotóxicos se destacam dentre as células do sistema imunológico por apresentarem ação direta de combate as células tumorais, como também podem favorecer a progressão do tumor. Assim, manipular essas células para um perfil antitumoral é grande alvo de estudos para terapias para o câncer (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011a).

Dentre as diferentes etapas de progressão da doença, quando os casos de câncer são diagnosticados em estágio metastático, o prognóstico é ruim, levando a morbidade dos indivíduos e a grande dificuldade de tratamento clínico (STEEG, 2016). É o que acontece no caso do melanoma, câncer originado em melanócitos, sendo um dos tipos mais agressivos de câncer de pele por ter alto potencial metastático. Os tratamentos para o melanoma variam desde a remoção cirúrgica - quando o diagnóstico é realizado nos estágios iniciais – até a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia alvo. Essas terapias, entretanto, além de causarem muitos efeitos colaterais, em alguns casos não são tão efetivas. Isso porque 30% dos pacientes que estão em estágio avançado da doença, não são responsivos a primeira linha de tratamentos, como a imunoterapia, assim como, os pacientes que não apresentam a mutação mais frequente em melanoma (BRAF, que é cerca de 50% dos casos), mostram limitações à terapia alvo. Soma-se a isso o fato de que pacientes com melanoma metastático têm uma sobrevida média de 6 a 9 meses após o

diagnóstico (GARBE *et al.*, 2016; KOZAR *et al.*, 2019b). Por essa razão, é de suma importância estudos de outros compostos que apresentem uma atividade antitumoral, e que possuam efeitos adversos amenos ou, de preferência, nulos.

Há uma diversidade de estudos que demonstram efeitos antimelanoma de polissacarídeos. Esses são obtidos a partir de fungos (principalmente em cogumelos), plantas e algas. Dentre suas diversas funcionalidades biológicas, são relatadas atividades antitumorais através da inibição do crescimento tumoral, interferindo na progressão do ciclo celular, inibição de angiogênese, indução de apoptose, aumento de imunocompetência, diminuição de capacidade metastática e perda de viabilidade celular (ZONG; CAO; WANG, 2012a).

Dentre os polissacarídeos com atividade antimelanoma e que apresentam atividade imunoestimulatória, as galactomananas se destacam. O DAVANAT®, produzido a partir de hidrólise ácida parcial da goma guar, que corresponde a uma galactomanana. Atualmente, esse composto encontra-se na fase II de testes clínicos por apresentar atividade antitumoral e imunomoduladora (CLINICALTRIALS.GOV IDENTIFIER: NCT00388700, 2006 DEMOTTE *et al.*, 2014a). Relativamente ao DAVANAT®, Barddal e colaboradores (2020) descreveram a síntese de um polímero que lhe é similar, porém com massa molar reduzida (CGH, nesse trabalho denominado GGH). Esse composto foi quimicamente sulfatado, e assim denominado GGHS, que mostrou ter efeito anticoagulante e antitrombótico considerável (foi testado 1 µg/ml *in vitro* e 5 mg/kg *in vivo*) (BARDDAL *et al.*, 2020). Resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de investigação de polissacarídeos sulfatados, do Departamento de Biologia Celular - UFPR) demonstraram um importante efeito antitumoral *in vitro* em células de melanoma murino quando expostas a GGH e GGHS (100 µg/ml por 24h e/ou 72h). Foi observado que a viabilidade celular não foi afetada, mas houve uma redução da proliferação celular apenas quando as células foram expostas a GGHS, o que alterou a dinâmica do ciclo celular delas. Além disso, ambos os compostos reduziram a capacidade de invasão celular e o tamanho das colônias formadas no ensaio clonogênico (BRAZ JUNIOR, 2020).

Outro polissacarídeo muito utilizado no tratamento do câncer é a heparina. Nesse sentido, desde que foi descoberta a relação entre trombose e câncer pelo médico Armand Trousseau, o uso de heparina (um polissacarídeo da família dos glicosaminoglicanos) para tratamento de complicações tromboembólicas associadas ao câncer tornou-se amplamente conhecido. Os dados da literatura demonstram que

a utilização de heparina não só aumenta a sobrevida dos pacientes com câncer e tromboembolismo, como também é capaz de interferir em etapas de metástase em melanoma (BORSIG, 2010). Ainda assim, o tratamento com heparina pode levar a casos de desregulação hematológicas relacionadas com o sistema de coagulação, como por exemplo a trombocitopenia, ou seja, o baixo nível de plaquetas no sangue (GRAY; MULLOY; BARROWCLIFFE, 2008). Por isso, outros compostos derivados de heparinas foram desenvolvidos a fim de reduzir seus efeitos colaterais para o uso crônico. Dentre esses compostos está a heparina de baixo peso molecular (LMWH, do inglês *Low Molecular Weight Heparin*), que é derivada da degradação parcial da heparina não fracionada e possui atividade anticoagulante reduzida, fator este, que diminui os efeitos adversos do uso da heparina não fracionada e mantém seu efeito antitumoral (BORSIG, 2010). Dados prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que o tratamento com células da linhagem B16-F10 (melanoma murino), quando expostas à LMWH (100 µg/ml por 72h) *in vitro*, foi capaz de diminuir os processos de invasão e migração celular (SANTI, 2015). Ademais, utilizando o mesmo modelo celular *in vivo*, o tratamento com LMWH (1 mg/kg e 5 mg/kg por 10 dias) foi capaz de inibir o crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 com tumor subcutâneo em tratamento terapêutico (iniciado após o surgimento do tumor) (COSTA, 2014). Da mesma forma, a LMWH (1 mg/kg por 16 dias) reduziu a quantidade de focos metastáticos, em experimento *in vivo* de colonização pulmonar, sem induzir efeitos adversos detectáveis pelos parâmetros hematológicos analisados. Vale ressaltar, por fim, que foi possível observar um aumento na porcentagem de linfócitos de amostras sanguíneas dos animais tratados com LMWH, indicando uma possível ação desses na contenção do desenvolvimento de focos metastáticos (CRISTAL, 2019).

Todavia, apesar dos resultados promissores obtidos com GGH e GGHS de efeito antitumoral em células de melanoma murino B16-F10, ainda não há estudos sobre o seu efeito em modelos *in vivo*, razão pela qual, a presente pesquisa torna-se relevante. Considerando que, ainda, GGHS tem atividade antitrombótica e é obtido de fonte vegetal, o que implica em ser extraído de uma fonte renovável, uma análise comparativa com um composto antitrombótico já utilizado na clínica, que apresente certa similaridade com a GGHS será realizada. É o caso da LMWH, que ostenta semelhanças relativas à atividade anti-Xa e anti-IIa, o fato de serem sulfatadas, carregadas negativamente e por apresentarem baixo peso molecular.

Por fim, o presente estudo se justifica pelo fato de o melanoma ser um câncer agressivo, com prognóstico desfavorável em estágios avançados, dado seu alto potencial metastático. Soma-se a isso, o fato de que os tratamentos atuais, em sua maioria, possuem baixa efetividade e acentuados efeitos adversos. Por tal razão, é necessária a busca por novos potenciais agentes antitumorais, com efeitos adversos baixos ou nulos. Conforme exposto anteriormente, os compostos GGH e GGHS demonstraram ter um grande potencial antitumoral *in vitro* em células B16-F10. No entanto, ainda é necessária uma investigação da sua atividade antitumoral e antimetastática *in vivo*, comparando-se com a LMWH em um contexto de tratamento terapêutico. Da mesma forma, é importante examinar quais seriam os possíveis efeitos sobre o sistema imune, uma vez que os compostos de estudos têm potencial atividade estimulatória em células do sistema imune.

1.1 JUSTIFICATIVA

O melanoma é um câncer agressivo com um prognóstico desfavorável em estágios avançados da doença, devido ao seu alto potencial metastático. Além disso, os tratamentos atualmente disponíveis têm baixa eficácia, apresentam efeitos adversos pronunciados e muitas vezes, os pacientes, não são responsivos a eles. Portanto, é necessário buscar novos agentes para combater o melanoma e estimular a resposta imune, dado que as células do sistema imunológico desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do câncer.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Com base nos resultados que demonstraram a atividade antitumoral de GGH e GGHS *in vitro*, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos desses compostos no microambiente tumoral, com foco nas células do sistema imune, e sua eficácia contra o melanoma, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

1.2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral do trabalho, a ação dos compostos de estudo será avaliada sobre modelos murino *in vivo* e *in vitro* nas seguintes abordagens:

- Avaliar se GGH e GGHS atuam no processo de desenvolvimento tumoral *in vivo*, em tratamento terapêutico, empregando o modelo de tumor sólido.
- Avaliar se GGH e GGHS atuam no processo de desenvolvimento de nódulos tumorais com tratamento terapêutico, empregando o modelo de metástase experimental.
- Entender se os compostos atuam sobre as células do sistema imune no contexto de microambiente tumoral.
- Avaliar comparativamente os efeitos de GGHS e LMWH no desenvolvimento tumoral e desenvolvimento de nódulos metastáticos *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é classificado como um conjunto de mais de 200 doenças que apresentam em comum a desregulação dos processos de manutenção tecidual, como a proliferação crônica das células, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular - permitindo a imortalidade replicativa - indução de angiogênese e ativação de dinâmicas de invasão celular e de metástase. Por trás dessas características está a instabilidade do genoma, que gera a heterogeneidade das células dentro de um tumor e acelera o processo neoplásico (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; WELCH, 2016). Recentemente foram descritas outras características relevantes para o desenvolvimento neoplásico. Essa são a plasticidade fenotípica, relacionada com a diferenciação celular, e alterações epigenéticas (HANAHAHAN, 2022).

Essas doenças neoplásicas surgem a partir do acúmulo de mutações ou modificações epigenéticas, as quais levam a um quadro de mudanças no DNA de células somáticas, que podem ser causadas por agentes físicos, químicos e/ou biológicos, como radiação ionizante, tabaco e vírus. Além disso, fatores ambientais e estilo de vida, podem favorecer o desenvolvimento de câncer por atuarem nas formas de pressão seletiva do ambiente tecidual, como alterações na circulação de nutrientes e hormônios podem favorecer a propagação de células neoplásicas (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

Uma característica crucial da doença é a habilidade das células neoplásicas de escapar do seu local primário *in situ*, se disseminar pela circulação e se espalhar pelo corpo, culminando com a formação de tumores em locais distantes, também conhecidos como tumores secundários (GUI; BIVONA, 2022). A ocorrência desse processo, denominado metástase, em um paciente com câncer pode ser variável, uma vez que a colonização metastática depende, em parte, da habilidade das células disseminadas em iniciar tumores, bem como de possuir programas adaptativos que lhes permitam sobreviver em tecidos diferentes do tumor primário (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

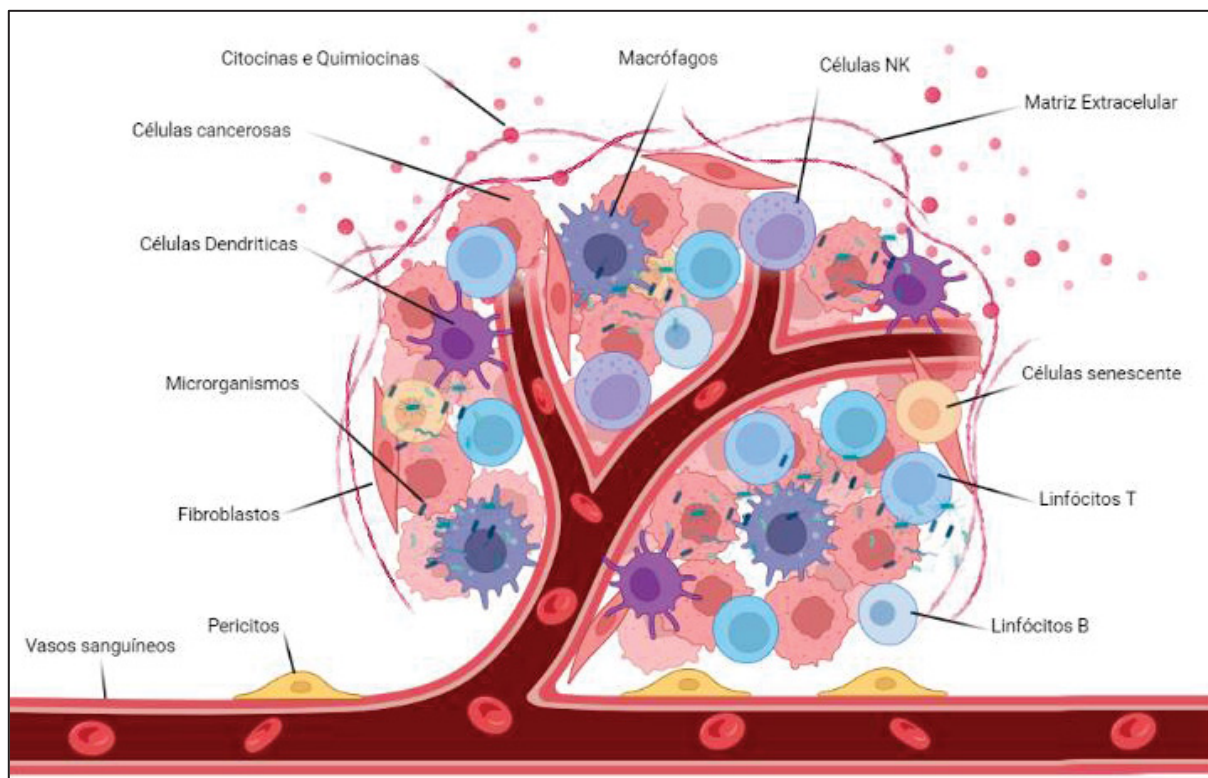
2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL

Os tumores não são compostos apenas por células neoplásicas, mas também por outras células recrutadas e uma complexa rede de moléculas, criando assim o microambiente tumoral. Esse ambiente é constituído por células tumorais em proliferação, estroma tumoral, vasos sanguíneos, células inflamatórias infiltrantes e uma variedade de células teciduais associadas, como fibroblastos, pericitos, células-tronco cancerosas, células senescentes e microrganismos associados ao câncer (HANAHAHAN, 2022; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; WHITESIDE, 2008). Essas células não neoplásicas podem atuar a favor ou contra o tumor, influenciando os processos de proliferação, angiogênese, metástase e balanço energético, por exemplo (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012; HANAHAHAN, 2022; HANAHAHAN; COUSSENS, 2012; KIM; EMI; TANABE, 2007). Os componentes não celulares do microambiente tumoral, como a matriz extracelular, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios também são de grande importância para o sistema de comunicação celular e progressão tumoral (ANDERSON; SIMON, 2020) (FIGURA 1).

Dentre os constituintes do microambiente tumoral, o sistema imunológico apresenta um papel importante e complexo no combate ou favorecimento dos tumores. Os primeiros estudos sobre a relação entre o sistema imune e o câncer foram propostos por Paul Erlich e Lewis Thomas nos anos 50. Erlich inicialmente relacionou a diminuição de carcinoma via sistema imune e Thomas associou uma resposta imune natural contra os tumores de maneira similar que um organismo rejeita um transplante, por exemplo (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004c). A partir disso, vários estudos

levaram a identificar a ação das células do sistema imune no reconhecimento e eliminação de células cancerosas. Esse mecanismo foi denominado *immune surveillance* (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; DUNN *et al.*, 2002a; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004a; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011a; VESELY *et al.*, 2011).

Figura 1: Microambiente tumoral.



FONTE: O Autor (2023).

CRÉDITOS: BioRender.

Embora haja evidências de que o sistema imunológico pode combater o câncer diretamente, há casos clínicos em que pacientes com sistema imunológico intacto desenvolvem tumores. Por isso muitos estudos demonstraram que a função de *immune surveillance* era apenas uma parte inicial da interação do sistema imune com o tumor.(DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004a; KIM, 2007; MITTAL *et al.*, 2014). Assim foi descoberto uma dinâmica entre esses dois componentes tumorais e que ao longo do tempo se dividem em três fases: a eliminação, o equilíbrio; e o escape (MITTAL *et al.*, 2014) (FIGURA 2).

A primeira fase do processo de eliminação é marcada pelo reconhecimento das células cancerosas pelas células do sistema imune inato e adaptativo e que desencadeiam a morte dessas células (*immune surveillance*). Esse reconhecimento é mediado pelos antígenos tumorais ou antígenos associados a tumores (TAA, do inglês

tumor-associated antigens). Esses antígenos são proteínas que estão presentes na superfície das células tumorais ou são liberadas por elas e podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico. As células do sistema imune inato, como macrófagos, células dendríticas e células *natural killer* (NK), estão presentes inicialmente nesse processo, já que são células prontas para reconhecerem e eliminar qualquer tipo de célula alterada no tecido (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004a; MITTAL *et al.*, 2014). O próximo passo para respostas eficazes contra o câncer requer a expressão de antígenos tumorais capazes de propagar a expansão das células T CD4⁺ e CD8⁺ citotóxicas (CTL). Assim, a ativação coordenada e equilibrada do sistema imune inato e adaptativo é necessária para impedir o desenvolvimento do tumor (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011a).

Além disso, as moléculas liberadas no microambiente tumoral têm atuação na progressão tumoral. O processo de formação de novos vasos sanguíneos no tumor para suprir nutrientes para as células neoplásicas, causa pequenas rupturas no tecido circundante que induzem sinais inflamatórios que levam ao recrutamento de células do sistema imune inato. Essas células são então estimuladas a produzir IFN- γ , citocina que induz a morte tumoral por meio de mecanismos antiproliferativos e apoptóticos (SMYTH; GODFREY; TRAPANI, 2001). As quimiocinas produzidas durante o processo inflamatório recrutam mais células NK e macrófagos para o local e iniciam a produção recíproca de IFN- γ e IL-12 e eliminam mais células cancerosas por mecanismos envolvendo indução de apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral (TNF), perforina e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006). As células dendríticas que foram recrutadas para o local, após identificarem os antígenos de células tumorais, migram para linfonodos próximos e induzem o desenvolvimento de células T auxiliares CD4⁺ e de células T CD8⁺. Assim essas células se alojam no local do tumor, onde os linfócitos T citotóxicos destroem as células tumorais portadoras de antígeno cujas imunogenicidades foram aumentadas pela exposição ao IFN- γ produzido localmente (DUNN *et al.*, 2002b).

Embora o sistema imunológico seja eficaz no combate da progressão do tumor, algumas células neoplásicas conseguem sobreviver a essa fase inicial de eliminação. Essa etapa subsequente é conhecida como fase de equilíbrio, na qual o sistema imunológico mantém as células tumorais resistentes em um estado de dormência, ou seja, as células tumorais permanecem latentes no corpo do paciente por anos, até

eventualmente retomarem o crescimento como tumores primários recorrentes ou metástases (KIM, 2007; TENG *et al.*, 2008; ZUBIETA *et al.*, 2006).

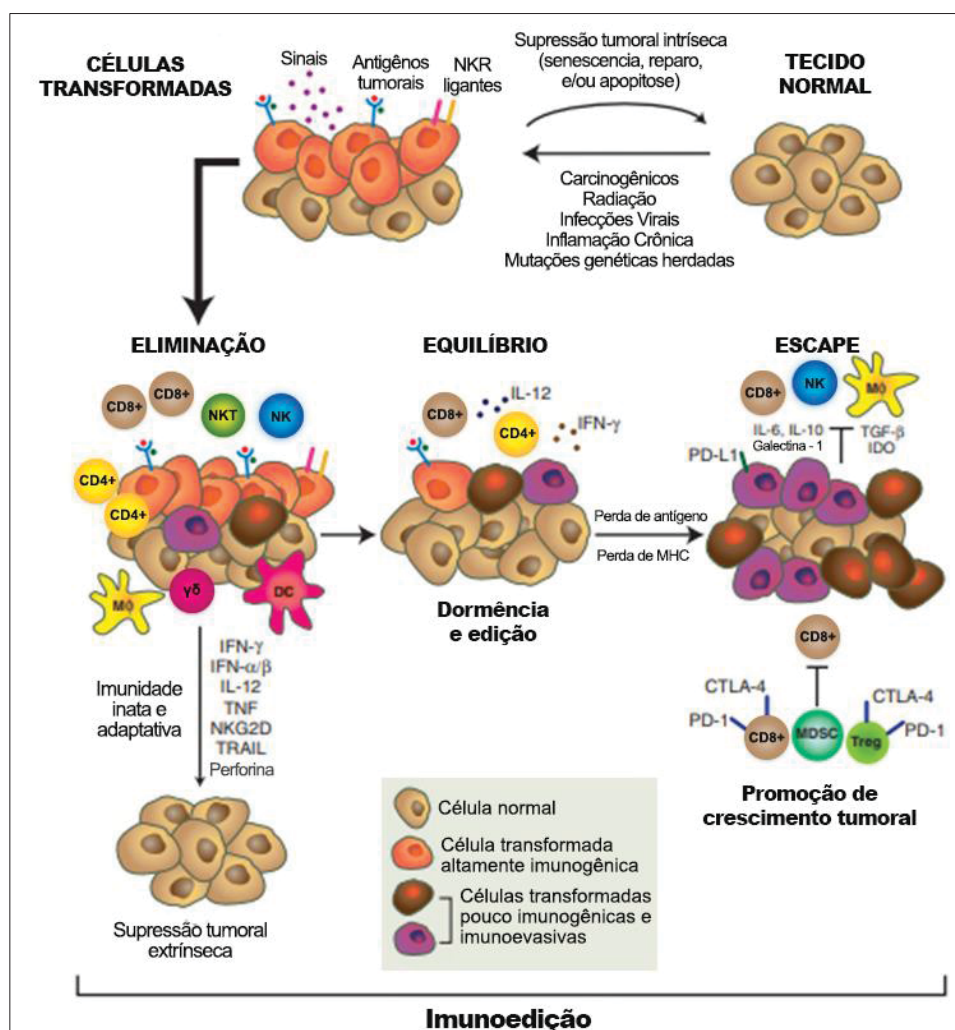
A progressão do equilíbrio para a fase de escape ocorre por diversos fatores. Um desses fatores é que as células tumorais não são mais reconhecidas pelas células do sistema imune, pela perda de antígeno ou por desenvolverem erros no processamento ou apresentação de antígenos. Outro fator é que as células neoplásicas não são mais afetadas pelos mecanismos de destruição imunológicos, ou induzem um estado imunossupressor dentro do microambiente tumoral. Essas células tumorais podem então entrar na fase de escape, na qual seu crescimento não é mais bloqueado pelas células do sistema imune (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004b; PASSARELLI *et al.*, 2017; SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011b).

Dentro do microambiente tumoral, as células cancerígenas geram citocinas imunossupressoras e atraem células reguladoras do sistema imunológico para funcionarem como efetores da imunossupressão. Por exemplo, as células T CD4 identificadas como linfócitos T regulatórios (Treg), caracterizadas pela expressão de CD25 e do fator de transcrição Foxp3, são recrutadas e inibem a função dos linfócitos T citotóxicos pela produção de citocinas imunossupressoras, tais como IL-10 e Fator de transformação de crescimento (TGF- β). Consequentemente, os linfócitos efetores expressam moléculas coestimuladoras negativas, tais como CTLA-4, PD-1 e PD-L1 (BEATTY; GLADNEY, 2015; VESELY *et al.*, 2011).

Dentre as células do sistema imune que compõem o microambiente tumoral os macrófagos constituem uma fração substancial do estroma tumoral. Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) derivam de monócitos originários da medula óssea, e do baço. Ao serem recrutados para os tumores, sinais liberados no ambiente por meio de interleucinas, citocinas e quimiocinas levam a diversos estados de polarização de macrófagos, dos quais duas extremidades de um espectro de ativação (M1 a M2) são comumente reconhecidas (BRONTE; MURRAY, 2015).

Os macrófagos M1 estão envolvidos na apresentação eficiente de antígenos e morte de patógenos; secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e interleucina 12 e 23 (IL-12 e IL-23) e são induzidas por citocinas liberadas por linfócitos T-helper tipo 1 incluindo interferon- γ (IFN- γ), interleucina-1 β (IL-1 β), e lipopolissacarídeo (LPS). Os macrófagos M2 apresentam alta atividade fagocitária, mas produzem baixas quantidades de citocinas pró-inflamatórias e maiores quantidades da citocina anti-inflamatória IL-10 (BOUTILIER; ELSAWA, 2021).

Figura 2: Sistema imune no microambiente tumoral.



FONTE: Adaptado de SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011d.

Em um contexto de câncer, há muitas evidências de que o perfil de macrófagos M1 é anti-tumoral e que o perfil M2 é pró-tumoral mediante suas funcionalidades (NAJAFI *et al.*, 2019; WEAGEL *et al.*, 2015). Além disso, em muitos tipos de câncer em que há um maior infiltrado de macrófagos M1 o prognóstico é melhor para o paciente (OSHI *et al.*, 2020; YUAN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014). No entanto, sabe-se que ao longo do desenvolvimento do tumor o perfil de macrófago que reside no local tende a uma polarização M2 e consequentemente ajudando o tumor a se desenvolver. Dessa forma, utilizar da estratégia de reprogramar esse perfil celular de M2 para M1 seria de grande interesse para o paciente (DEN BREEMS; EFTIMIE, 2016; MANTOVANI; SICA, 2010; TAMURA *et al.*, 2018).

Além dos macrófagos, outro tipo celular importante para o microambiente celular são os linfócitos T citotóxicos. Como explicado anteriormente, essas células têm a capacidade direta de eliminar uma célula cancerosa (MARTÍNEZ-LOSTAO;

ANEL; PARDO, 2015). Além disso, o número de CTL's dentro do microambiente tumoral é um marcador de prognóstico fundamental para o câncer e os tumores podem ser classificados com base no número de células em *cold* quando há poucos CTL's no tumor e *hot* quando há um maior número de CTL's infiltradas no tumor. A essa nomenclatura, também está associada a inflamação dentro do tumor, sendo *cold* pouco inflamatório e *hot* maior perfil inflamatório (BONAVENTURA *et al.*, 2019; HAANEN, 2017).

Os tumores com maior quantidade de CTL's são mais propensos a responder à imunoterapia do que os tumores com baixa quantidade dessas células. De fato, existe uma correlação direta entre a proliferação de CTLs intratumorais com a redução do tamanho do tumor, e que a regulação negativa das células pode causar resistência imune adaptativa (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEI, 2019).

Além de todo esse estudo voltado ao microambiente tumoral não podemos deixar de lado o fato de que o câncer é uma doença sistêmica que induz muitas alterações funcionais e composicionais ao sistema imunológico como um todo. Por exemplo, muitas células mieloides – células derivadas do progenitor mielóide, como plaquetas, eritrócitos, granulócitos e monócitos - são frequentemente renovadas a partir de precursores hematopoiéticos na medula óssea, e a maturação inicial de células T normalmente ocorrem em tecidos linfóides antes de chegarem no local de ação. Portanto, uma compreensão completa das respostas imunes ao câncer deve abranger todas as linhagens de células imunes em todo o sistema imunológico periférico, além do microambiente tumoral (HIAM-GALVEZ; ALLEN; SPITZER, 2021; NAKAMURA; SMYTH; MARTINET, 2020).

Dentre os tipos de câncer o melanoma é considerado um dos tipos de tumores mais imunogênicos. Um grande grupo de antígenos foi originalmente identificado em melanoma e denominado 'antígenos associados ao melanoma' que são reconhecidos por linfócitos T citotóxicos (FU *et al.*, 2019). Além disso, as células tumorais de melanoma e o microambiente tumoral secretam citocinas imunossupressoras, como TGF β , que podem inibir a resposta imune. Mesmo os pacientes com melanoma que apresentam linfócitos ativos, seus tumores usam muitos métodos para evitar a citotoxicidade, incluindo mutações ou regulação negativa dos componentes do MHC-1; bloqueio de co-receptores de células T CD4+ e CD8+; burlar o sistema de resposta imune através da expressão de CTLA-4 e PD-1; desregulação de células dendríticas; e aumento do número de células T reguladoras (BRAEUER *et al.*, 2014).

2.3 MELANOMA

O melanoma é um tipo de câncer que surge a partir dos melanócitos. Estas são células especializadas na produção de melanina e são originadas a partir das células da crista neural, sendo encontradas predominantemente na camada basal da epiderme. A melanina é um pigmento responsável pela coloração da pele e proteção contra radiação ultravioleta (BRENNER; HEARING, 2008; CICHOREK *et al.*, 2013).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma são exposição à radiação ultravioleta (UV), histórico familiar, imunossupressão, presença de múltiplos *nevus* e apresentar a pele clara (WHITEMAN; WHITEMAN; GREEN, 2001). A intensa exposição à radiação UV causa danos ao DNA, gerando mutações genéticas e imunossupressão, além de induzir respostas inflamatórias que afetam a atividade dos melanócitos podendo levar à transformação maligna dessas células (CHHABRA *et al.*, 2017; GORDON, 2013).

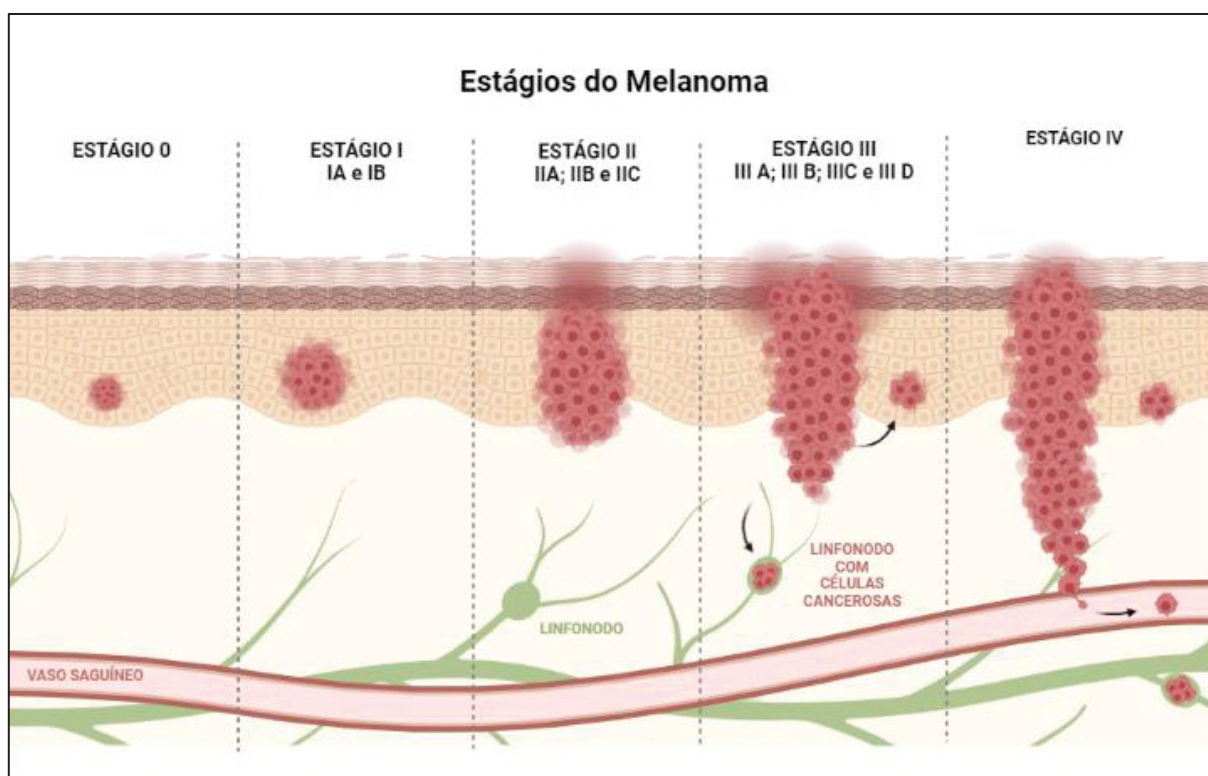
Esse tipo de câncer, quando metastático, é um dos mais heterogêneos e altamente mutados. A título de exemplificação, estima-se que o melanoma apresenta cerca de 0,1 mutações por 100 mega base (MB) e, dentre essas estão mutados principalmente os genes *BRAF* (50%), *NRAS* (25%), e *NF1* (14%), sendo todos relacionados com o aumento da proliferação e sobrevivência celular, etapas importantes para desenvolvimento primário do tumor (DAVIS *et al.*, 2018; KOZAR *et al.*, 2019a; SHAIN *et al.*, 2015).

O melanoma é um dos tipos de câncer mais agressivos por apresentar uma série de características que o capacita a realizar metástase. As células do melanoma apresentam aumento de expressão de moléculas de adesão na superfície celular que permitem a intravasão e extravasão em vasos sanguíneos; indução de produção de metaloproteinases; migração e plasticidade celular. Isso permite que os tumores de melanoma sejam altamente angiogênicos e utilizam o microambiente tumoral para promover a proliferação celular e o crescimento do tumor (BRAEUER *et al.*, 2014; THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

Segundo a organização *American Joint Committee on Cancer* o melanoma tem uma classificação distinta em 10 estágios que dependem de três principais parâmetros (FIGURA 3). O primeiro parâmetro do melanoma primário é a espessura do tumor (T). Essa classificação se subdivide em outros grupos conforme a ausência ou presença

de ulceração (uma ruptura na camada externa da pele sobre o melanoma). O segundo parâmetro é usado para descrever quantos nódulos linfáticos contêm células de melanoma (N). A categoria N inclui subcategorias para descrever o número de células cancerosas nos gânglios linfáticos. A terceira classificação é a de metástase (M) que leva em consideração se o câncer se espalhou além da região onde o melanoma começou para locais distantes (GERSHENWALD *et al.*, 2017).

Figura 3: Estágios do melanoma.



FONTE: adaptado de Gershenwald e colaboradores, 2017.
CRÉDITOS: BioRender.

Como todos os cânceres malignos, o melanoma tem uma propensão a metastizar para certos órgãos, como os linfonodos, pulmão, fígado, cérebro e ossos (LEUNG; HARI; MORTON, 2012). Embora o microambiente nesses locais possa ser ideal para as células de melanoma se desenvolverem, elas devem primeiro ser capazes de localizar e extravasar para esses órgãos em específico (ARAP *et al.*, 2002).

Assim esse reconhecimento distinto vascular pode desempenhar um papel importante na metástase de melanoma. Com relação a isso destaca-se a galectina-3 que pode induzir interações heterotípicas de células de melanoma com células endoteliais no pulmão através de moléculas glicosiladas de superfície celular, assim, demonstrando que a expressão da galectina-3 nesse órgão é importante para a

metástase direcionada das células de melanoma altamente glicosiladas (KRISHNAN *et al.*, 2005). As galectinas são proteínas que possuem um domínio de ligação para β galactosídeos e já foi comprovado que há uma superexpressão de galectinas 3 e 1 em tumores de melanoma, e isso está relacionado com um pior prognóstico (BRAEUER *et al.*, 2014). Além da atuação das galectinas na adesão, foi demonstrado que a galectina-1 aumenta a defesa tumoral contra o sistema imune, diminuindo a infiltração de células T CD4⁺ e CD8⁺, e induzindo essas células a apoptose em melanoma (BANH *et al.*, 2011).

Outro mecanismo funcional que afeta potencialmente a atividade dos linfócitos T contra o melanoma inclui a expressão defeituosa de receptores de *checkpoint* imunológico - proteínas de superfície celular (como o antígeno - 4 de linfócitos T citotóxicos [CTLA-4] e o de morte celular programada - 1 [PD-1]), cuja função é controlar o início, a duração e a magnitude da resposta imune (PASSARELLI *et al.*, 2017). Vale ressaltar que o processo de ativação de CTL's requer dois sinais. O primeiro é da ligação do receptor da célula T (TCR) à molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) apresentada por uma célula apresentadora de antígeno (APC). O segundo sinal coestimulatório surge de uma das várias vias de interação entre essas duas células, sendo uma delas a interação do CD28 com B7 expressa nas APCs. A molécula CTLA-4, sendo um análogo a CD28, compete pela ligação a B7, no entanto essa ligação tem um efeito não estimulatório, diminuindo assim a resposta imune das células T (BUCHBINDER; DESAI, 2016). A molécula PD-1 é semelhante ao CTLA-4, tem dois ligantes correspondentes, PD-L1 e PD-L2 expresso por APCs e inibe eventos pró-inflamatórios, como proliferação de células T e produção de citocinas (KEIR *et al.*, 2008).

Além desse processo, muitas citocinas e quimiocinas presentes no contexto tumoral do melanoma são responsáveis pelo recrutamento e direcionar a ação das células do sistema imune presentes no microambiente tumoral. Dentre elas destacam-se TGF- β , IL-12, IL-6, IL-10, MCP-1, INF- γ e TNF- α (ELIAS; HASSKAMP; SHARMA, 2010; LÁZÁR-MOLNÁR *et al.*, 2000; RICHMOND; YANG; SU, 2009). As citocinas IL-12, INF- γ e TNF- α tem um papel crucial na eliminação das células de melanoma pelo fato de atuarem induzindo uma resposta antitumoral em células do sistema imune (BRÖCKER *et al.*, 1988; BROUCKAERT *et al.*, 1986; BRUNDA *et al.*, 1993; HELSON *et al.*, 1975). Com relação a MCP-1, essa é a principal quimiocina de recrutamento de linfócitos e macrófagos para o tumor. A presença dessa no ambiente tumoral pode

levar tanto a redução quanto progressão tumoral de melanoma (BROWN *et al.*, 2007; GAZZANIGA *et al.*, 2007; NAKASONE *et al.*, 2012). As demais moléculas têm um papel pro-tumoral do melanoma por desencadear um estímulo imunossupressor nas células imunes (ITAKURA *et al.*, 2011; LÁZÁR-MOLNÁR *et al.*, 2000; VAN BELLE *et al.*, 1996).

Diante disso, muitos marcadores já vêm sendo estudados, como moléculas expressas em células do sistema imune e melanoma, citocinas e quimiocinas, e a partir disso novas abordagens terapêuticas para o melanoma surgem.

2.3.1 Tratamentos para o melanoma

O tratamento mais usual para melanoma em estágios iniciais consiste na remoção cirúrgica, sendo essa a abordagem mais efetiva para extinguir tumores primários, consistindo em uma excisão local com diferentes margens de segurança dependendo da classificação de Breslow (HARTMAN; LIN, 2019).

O melanoma quando diagnosticado em estágio avançado apresenta prognóstico ruim, sendo a quimioterapia muito utilizada na clínica, com o uso separadamente ou em combinação com outras drogas, mas ainda tem baixa eficácia. A Darcabazina e seu análogo, Temozolomide, são ainda os principais quimioterápicos utilizados no tratamento do melanoma. No entanto, muitos estudos demonstraram que ambos apresentam baixa eficácia, com mediana de duração de resposta de 5-6 meses e menos de 2% de sobrevivência dos pacientes 6 anos depois do início do tratamento (MISHRA *et al.*, 2018).

Nas últimas décadas vêm sendo estudados inibidores de *checkpoint* imunológico e terapia direcionada no tratamento do melanoma metastático. Devido à alta resistência das células do melanoma tem sido buscado tratamentos direcionados a biomarcadores específicos que levam a progressão desse câncer. Os inibidores de *BRAF* (oncogene mutado mais comum no melanoma) e de *MEK* (gene presente na mesma cascata de sinalização de *BRAF*) são os tratamentos mais utilizados e apresentaram redução de metástases e na progressão de tumores sólidos em pacientes. Apesar dessas terapias serem efetivas contra tumores, seus efeitos adversos, como pirexia, calafrios, dor de cabeça, diarreia, náusea e vômito pode levar a desistência ou substituição do tratamento pelo paciente (MISHRA *et al.*, 2018; ROZEMAN *et al.*, 2018; SCHADENDORF *et al.*, 2018).

Além disso, a epidemiologia clínica também apoia cada vez mais a existência de respostas imunes antitumorais em algumas formas de câncer humano (BINDEA *et al.*, 2010; FERRONE; DRANOFF, 2010; NELSON, 2008). Por exemplo, pacientes com tumores de cólon e ovário que são fortemente infiltrados com CTLs e células NK têm um prognóstico melhor do que aqueles que não as possuem abundantemente (NELSON, 2008; PAGÈS *et al.*, 2010). Desta forma grande relevância tem sido dada à imunoterapia, que aumenta o potencial da resposta imune contra tipos de câncer de pele altamente imunogênicos, como o melanoma, assim como aumenta a remoção de células cancerosas danificadas pela citotoxicidade das drogas. Interleucina-2, Interferon alfa, ipilimumab e timosina alfa 1 são as principais imunoterapias utilizadas no tratamento de melanoma. Com a introdução da imunoterapia outros efeitos adversos relacionados à resposta imune vêm sendo descritos, como diarreia e dores articulares, demonstrando que a certo nível a imunoterapia pode ser tóxica ao paciente (DOMINGUES *et al.*, 2018; MISHRA *et al.*, 2018; ROZEMAN *et al.*, 2018).

As opções de tratamento para pacientes com melanoma avançado aumentaram na última década e a introdução de terapia direcionada e imunoterapia levou a uma melhora significativa na sobrevida dos pacientes, com taxas de sobrevida de 1 e 2 anos (de 70 e 50-60% respectivamente) (ROZEMAN *et al.*, 2018), em comparação a quinze anos atrás em que a sobrevida de pacientes com melanoma metastático era de 7 a 10 meses, quando tratados com quimioterapia (EIGENTLER *et al.*, 2003).

No Brasil, com relação aos casos de pacientes com melanoma avançado, o uso da dacarbazina ainda é o principal meio de tratamento. No entanto, recentemente houve a autorização para incorporar ao SUS os imunoterápicos nivolumab e pembrolizumab na lista de fármacos de primeira linha para melanoma não cirúrgico metastático, com prazo de implementação até janeiro de 2021, demonstrando avanço na adoção de novos fármacos que focam diretamente na célula tumoral, mas sim em seu microambiente (BRASIL, 2020).

O grande problema no tratamento atual do melanoma está na baixa taxa de resposta. A quimioterapia, por exemplo, não consegue tratar o melanoma devido à resistência das células tumorais e, ainda causa a morte de muitas células normais do corpo, gerando efeitos colaterais tóxicos. A imunoterapia e a terapia direcionada, apesar de apresentarem um significativo ganho de sobrevida dos pacientes com melanoma, ainda assim apresentam efeitos adversos significantes, o que afeta a

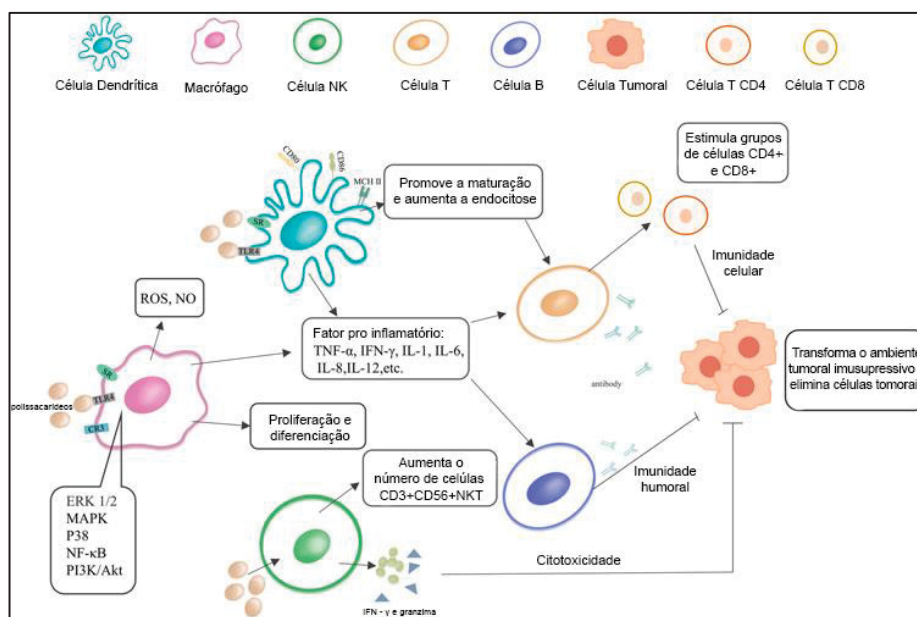
qualidade de vida dos pacientes (HODI *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2017). Diante disso, ainda é necessária a busca por terapias que sejam eficazes no combate do melanoma e que apresentem baixos efeitos adversos para os pacientes.

2.3.1.1 Polissacarídeos

Nos últimos anos, vários estudos mostraram a atividade biológica de polissacarídeos. Esses são biopolímeros compostos por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, podendo ser lineares ou conter cadeias laterais ramificadas. Devido a isso, os polissacarídeos podem ter diversas estruturas de composição e tamanhos. Além disso, os efeitos adversos dos polissacarídeos no corpo são pequenos, então há um grande interesse de estudo dessas moléculas como tratamento para o câncer, por exemplo (LAURIENZO, 2010; MAZEPA *et al.*, 2022; MENG; LIANG; LUO, 2016; ZONG; CAO; WANG, 2012b).

Dessa forma, muitos estudos já demonstraram que diversos polissacarídeos têm ação antimelanoma atuando na diminuição da proliferação celular (JIN *et al.*, 2020; TEVYASHOVA *et al.*, 2007) ou alterando parâmetros de malignidade das células de melanoma (*in vitro*) e redução do volume tumoral e de focos de metástase *in vivo* (BAE *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 1999, 2006; HUSSEIN; HUSSEIN MSCPATH, 2006; LIU; SUN, 2021; LÓPEZ-JANEIRO *et al.*, 2020; MIGNOGNA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2007). Outra abordagem antimelanoma dos polissacarídeos é a estimulação do sistema imune. Nesse caso, os polissacarídeos podem atuar também na ativação de macrófagos, células NK, CTL's, células dendríticas e na estimulação da liberação de várias citocinas, incluindo interferons, fator de necrose tumoral, interleucinas e fatores estimuladores de colônias, o que aumenta a viabilidade teórica para estudos subsequentes de polissacarídeos como adjuvantes imunoestimulantes (BANERJEE; PARASRAMKA; PARUTHY, 2015; LI *et al.*, 2021) (FIGURA 4).

Figura 4: Atividade imunoestimulatória de polissacarídeos no contexto tumoral.



FONTE: Adaptado de LI e colaboradores, 2021.

As galactomananas são exemplos de polissacarídeos que apresentam atividade antitumoral comprovada. Em um estudo desenvolvido por Varghese e colaboradores, demonstraram que uma galactomanana extraída da romã (denominada PSP001), *Punica granatum*, de massa molecular de 110 kDa, reduziu traços de malignidade em células de melanoma murino (B16-F10) e humano (A375) *in vitro*, como a redução de invasão e migração (100µg/ml, por 24h), de formação de colônias (100 e 200 µg/ml, por 72h), diminuição na expressão de VEGF, MMP-2 e MMP-9, bem como aumento da expressão TIMP-1 e TIMP-2. Além disso, *in vivo*, demonstraram a redução no desenvolvimento de nódulos pulmonares em modelo de metástase experimental murino pela PSP001 (200 mg/kg por 10 dias) (VARGHESE *et al.*, 2017a). Destaca-se também outra galactomanana, a goma guar (GG) presente em sementes da planta *Cyamopsis tetragonoloba* (GUPTA *et al.*, 2015). A goma guar é composta por manose e galactose, em proporções que variam de 1,6:1 até 2:1 e cuja cadeia principal apresenta unidades de manose β-(1→4) ligadas e substituídas em O-6 por unidades de α-galactose (YOON; CHU; RAJ JUNEJA, 2008). Dentre os diversos estudos sobre a atividade biológica da goma guar, destaca-se a ação de uma que foi glicosilada e sulfatada, pois mostrou aumento da proliferação e da capacidade fagocítica de macrófagos (RAW 264.7), além de diminuir a proliferação, *in vitro*, de células de hepatocarcinoma (HepG2) e câncer de mama (MCF-7) (GAMAL-ELDEEN; AMER; HELMY, 2006). Outro composto obtido a partir da goma guar é conhecido comercialmente por Davanat®. Esse composto, em estudos *in vivo* utilizando modelo

de câncer colorretal (linhagem celular COLO 205), diminuiu o crescimento tumoral e aumentou a sobrevida dos animais (KLYOSOV; ZOMER; PLATT, 2012).

Em uma pesquisa recente, desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que um composto obtido da hidrólise parcial da goma guar e posteriormente sulfatado (denominado de GGHS), quando utilizado na concentração de 100 µg/ml por 24h ou 72h, apresenta uma atividade antitumoral *in vitro* em células de melanoma murino. Observou-se que não alterou a viabilidade celular; apresentou efeito antiproliferativo, alterando a dinâmica do ciclo celular, reduziu a invasão celular e o tamanho de colônias formadas no ensaio clonogênico. Ainda, demonstrou grande potencial de se ligar à galectinas 1 e 3, que são moléculas que desempenham um papel de progressão do melanoma, e assim sendo possíveis inibidores dessas moléculas (BRAZ JUNIOR, 2020). Vale ressaltar que esse composto também apresenta potencial anticoagulante e antitrombótico, com atividades muito semelhantes à da heparinas de baixo peso molecular (Clexane®) (BARDDAL *et al.*, 2020).

Diante disso, outra classe de polissacarídeos utilizados para o tratamento do câncer são as heparinas (LIMA; RUDD; YATES, 2017), cuja utilização estava inicialmente relacionada com a prevenção da formação de trombos que posteriormente podem se transformar em tromboembolismo venoso (TEV).

A trombose venosa é a formação de trombos (coágulos sanguíneos) em veias geralmente nos membros inferiores do corpo, e isso se dá através do mecanismo de coagulação. Esse é o processo no qual o sangue perde sua característica de fluido, gerando um coágulo pela interação das plaquetas, tecido, glóbulos vermelhos e fibrina (GOLDHABER, 2012). Os fatores de coagulação são, na sua maioria, enzimas do tipo serino proteases. A maioria dos fatores de coagulação se apresenta na forma inativa, denominada zimogênio, que quando ativada, provoca reações proteolíticas em cascata, ou seja, a ativação de uma enzima depende da ação de outra enzima anterior (FRANCO, 2001; PALTA; SAROA; PALTA, 2014). Há duas formas distintas de ativar a cascata de coagulação. Uma é denominada intrínseca que se refere à sequência de reações enzimáticas que se iniciam quando o sangue entra em contato com a superfície lesada. O outro é o extrínseco que se refere à sequência de reações que ocorrem quando a lesão de um vaso sanguíneo resulta na liberação de extratos teciduais. Estas duas vias convergem para a ativação do fator X que, por meio de uma via comum de ativação da trombina (VOGLER; SIEDLECKI, 2009). Além disso, há

mecanismos regulatórios da coagulação que atuam desde a inibição à modulação de fatores de coagulação. Dentre os diversos componentes do mecanismo regulatório - estão a antitrombina III, o cofator II de heparina (HCII) e os fatores fibrinolíticos (FRANCO, 2001).

A relação entre trombose e câncer é amplamente conhecida desde que Armand Trousseau, em 1865, descreveu que pacientes com câncer podem apresentar a formação de trombos por eventos trombóticos que precedem o diagnóstico de uma malignidade visceral oculta ou que aparecem simultaneamente com o tumor. A essa patologia foi nomeada como Síndrome de Trousseau (VARKI, 2007), que em um contexto tumoral é caracterizada pela capacidade das células tumorais de ativar constitutivamente a cascata de coagulação, levando a ativação de fator Xa, fator VIIa, trombina (fator IIa) e fibrina, moléculas relacionadas ao crescimento tumoral, angiogênese, invasão e metástases (BORSIG, 2010; FALANGA *et al.*, 2009; VARKI, 2007). Além disso, estudos envolvendo animais que apresentam fenótipo pró-trombótico mostraram que estes estão mais susceptíveis a colonização por metástase do que os que apresentam um fenótipo hemofílico (BRÜGGEMANN *et al.*, 2008).

Por isso, a heparina, que potencializa a ação inibitória exercida pela antitrombina e cofactor II de heparina, é comumente utilizada para a prevenção ou tratamento de complicações tromboembólicas em pacientes com câncer (FALANGA; MARCHETTI, 2007; ZACHARSKI; ORNSTEIN, 1998), levando a uma melhor sobrevida, como observado em muitos estudos clínicos. Sabe-se que a heparina é capaz de diminuir a progressão dos cânceres metastáticos de diversos tipos, como carcinoma mamário, de cólon, pulmão, bem como em melanoma (BORSIG, 2010).

No entanto, o tratamento com heparina é muito restrito, pois em alguns casos pode levar a hemorragia, bem como trombocitopenia, necrose da pele e osteoporose (GRAY *et al.*, 2008). Diante disso, foram obtidas outras moléculas derivadas de heparinas que tivessem seu potencial biológico anticoagulante reduzido, a fim de que um uso crônico fosse possível (reduzindo seus efeitos colaterais), bem como manter seu potencial antitumoral.

Assim foi desenvolvida a heparina de baixo peso molecular (LMWH), composto de estudo do presente projeto, que é derivada da hidrólise parcial ou ação enzimática das moléculas de heparina, possuindo atividade anticoagulante reduzida, mas mantendo a atividade antitrombótica, por isso é amplamente utilizada na prevenção e tratamento de complicações tromboembólicas em pacientes com câncer metastático

(HIRSH *et al.*, 2001; KLERK *et al.*, 2005; VAN DOORMAAL *et al.*, 2011). Estudos mostram que LMWH podem melhorar a sobrevida em pacientes com câncer, com mecanismos que são diferentes de seu efeito antitrombótico, estando ligados à capacidade de influenciar diretamente na biologia do tumor, reduzindo a proliferação, adesão celular, angiogênese e na regulação da transição epitélio-mesenquimal de células cancerígenas (BOBEK; KOVAŘÍK, 2004; ZHANG *et al.*, 2016). Como também podem ter efeitos antitumorais modulando o sistema imune e, aumentando a resposta de células NK em câncer de mama (FLUHR; SEITZ; ZYGMUNT, 2013).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a LMWH apresenta atividade em células de melanoma murino B16-F10, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Santi (2015) demonstrou que a LMWH (100µg/ml, por 72h) não induz citotoxicidade, como também não leva essas células à apoptose, porém o tratamento gera uma redução nos processos de migração e invasão celular, acompanhado de diminuição da atividade gelatinolítica, da expressão gênica das metaloproteinases 2 e 9 e da quantidade de ácido hialurônico. Costa (2014) evidenciou que o tratamento terapêutico com LMWH (1 mg/kg e 5 mg/kg por 10 dias) em camundongos C57BL/6 diminui o volume tumoral no modelo de tumor sólido. Também a LMWH (1 mg/kg por 16 dias), quando utilizada de forma terapêutica (5 dias após a inoculação das células), atua no desenvolvimento dos nódulos de colonização pulmonar *in vivo*, reduzindo a quantidade dos focos de metástase, alterando aspectos anatômicos e hematológicos sem induzir efeitos colaterais detectáveis pelos parâmetros bioquímicos analisados. Além disso, foi possível observar um aumento na porcentagem de linfócitos de amostras sanguíneas dos animais que foram expostos a este composto, indicando uma possível ativação destes, levando a contenção do desenvolvimento de focos metastáticos (CRISTAL, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR E ANIMAIS

A linhagem celular utilizada para os ensaios *in vivo* foi a B16-F10 de melanoma murino (Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ). As células foram cultivadas em garrafas de cultivo de 75cm² (Sarstedt, DE), com meio DMEM (Gibco Grand Island Biological Company, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco),

0,25µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina (Gibco) em 0,85% de solução salina. Essas foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, em atmosfera úmida por duas passagens após o descongelamento.

A linhagem celular utilizada para os ensaios *in vitro* foi a JURKAT, clone E6 de linfócito T humano (Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ). As células foram cultivadas em garrafas de cultivo de 75cm² (Sarstedt), com meio RPMI “ATCC modifications” (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), 0,25µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina (Gibco) em 0,85% de solução salina. Essas foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, em atmosfera úmida por cinco passagens após o descongelamento.

Os animais utilizados foram camundongos C57BL/6, machos, com idades entre 8 e 12 semanas, os quais foram adquiridos do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, e mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas, UFPR. Os experimentos *in vivo* foram realizados após aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA-BIO UFPR nº 1389).

3.2 COMPOSTOS EM ESTUDO

Foram utilizados os seguintes compostos: galactomanana parcialmente hidrolisada (GGH), de massa molecular média 31,5kDa; galactomanana parcialmente hidrolisada e quimicamente sulfatada (GGHS), de massa molecular média 15,6kDa; Heparina de baixo peso molecular (Low molecular weight heparina – LMWH), obtida comercialmente como Clexane®. Trata-se de uma enoxaparina sódica, com massa molecular média de 4,5kDa. Os dois compostos, GGH e GGHS, foram obtidos de acordo com o que foi descrito por Barddal e colaboradores (2020). Vale ressaltar que os compostos GGHS utilizado no trabalho é do mesmo lote de produção que o utilizado por Braz Junior, 2020. Com relação ao composto GGH foi sintetizado um novo lote e com análise por espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) obteve-se resultados similares ao que foi descrito por Braz Junior, 2020; A diluição dos compostos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi realizada para os experimentos *in vivo*. Já a diluição dos compostos em meio RPMI (Gibco) foi realizada para os experimentos *in vitro* e *ex vivo*. As doses para o estudo *in vivo* foram de 1 mg/kg e 5 mg/kg, conforme descrito previamente por Fukuda *et al.*, 2013, como dose

eficiente e segura para uma atividade antitrombótica em camundongos, o que já foi comprovada pelo nosso grupo com a LMWH (COSTA, 2014; CRISTAL, 2019). Para os experimentos *in vitro* e *ex vivo* foi utilizada a concentração de 100 µg/mL, conforme descrito por Braz Junior, 2020.

3.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR *IN VITRO* EM CÉLULAS DE LINHAGEM JURKAT

Para avaliar o efeito proliferativo de GGH e GGHS frente a linfócitos $2,6 \times 10^6$ células JURKAT foram ressuspensas a 5 ml de PBS contendo 5% de SFB (Gibco) inativado em um tubo falcon de 15 mL (Sarstedt). Com o tubo aberto e na horizontal foi adicionado 50 µl de Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (BD - Becton, Dickinson and Company, EUA) a 50 mM sem com que houvesse contato com a suspensão de células. O tubo foi fechado rapidamente e vertido várias vezes para homogeneização e depois ficou incubado por 10 minutos a 37°C. Após esse período foi adicionado 9 mL de meio RPMI (Gibco) com 5% de SFB (Gibco) e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Por fim, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura apropriado para posterior plaqueamento (1×10^5 células/ml) em placas de 24 poços (Sarstedt). Vale ressaltar que antes da marcação com CFSE (BD) 6×10^5 células foram separadas para o grupo branco e após 6×10^5 células foram separadas para o grupo CFSE positivo.

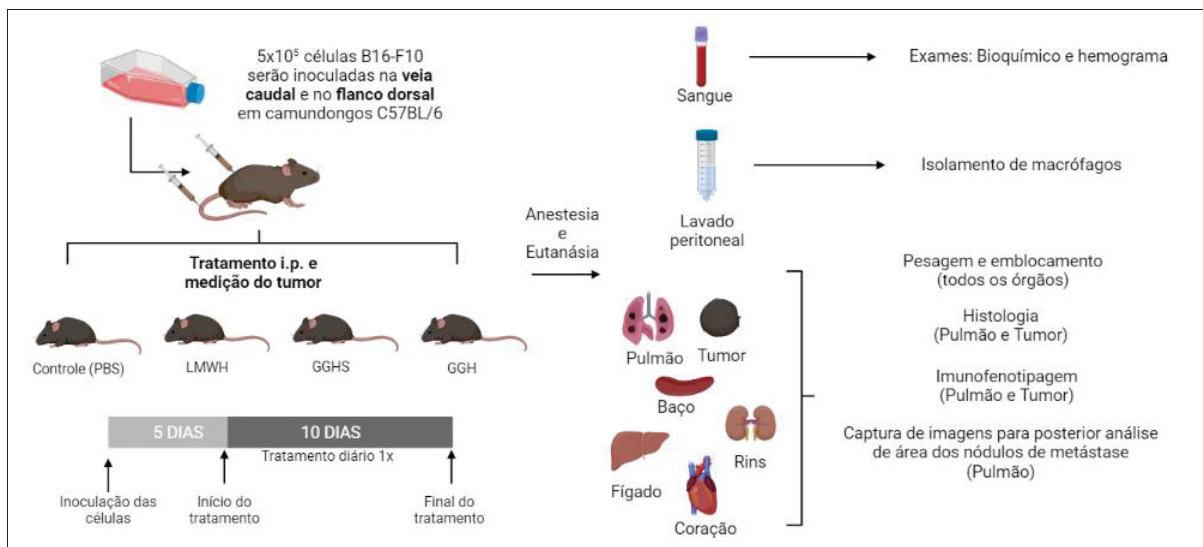
Após o plaqueamento as células foram tratadas com GGHS e GGH (100 µg/ml), mitomicina 5 µM (Sigma - Sigma-Aldrich, EUA) ou não (controle RPMI) e mantidas em cultura por 96h. No final do tempo de exposição as células foram fixadas com Paraformaldeído 2% (Sigma) e passadas para tubos de citometria. As amostras foram passadas no citometria BD FACSMelody™ Cell Sorter e analisadas nos programas FlowJo. O ensaio foi adaptado de Quah e Parish (2010).

3.4 MODELOS DE TUMOR SÓLIDO E METÁSTASE EXPERIMENTAL

Esses dois modelos foram realizados em uma estratégia de modelo duplo de melanoma (tumor sólido e colonização pulmonar simultâneos no animal). Para isso as células B16-F10 foram desaderidas das garrafas de cultura após atingirem 70 a 80% de confluência, através da incubação por 5 minutos com Tripsina (1%) (Sigma) em

PBS (pH 7,4), ressuspendidas em DMEM (Gibco), centrifugadas e lavadas duas vezes em PBS. As células foram contadas em Câmara de Neubauer empregando o corante Azul de Tripán (Sigma) diferenciando células viáveis de não viáveis. Foram injetadas 5×10^5 células em 0,1ml de forma subcutânea no flanco lateral da coxa direita dos camundongos para desenvolvimento de tumor sólido, e na veia caudal dos animais para experimento de metástase experimental.

Após 5 dias da inoculação, os animais foram tratados com os compostos ou com PBS (grupo veículo) por via intraperitoneal, sendo que o tratamento ocorreu uma vez por dia por 10 dias (do 5º ao 14º dia após a inoculação das células). Durante o período de tratamento os tumores foram medidos por um paquímetro, sendo que o volume tumoral foi determinado pela aproximação a figura de uma elipse (volume tumoral = $0,52 \times \text{diâmetro maior} \times \text{diâmetro menor}^2$). Os animais que tiveram os tumores maiores que 1000 m^3 foram retirados das análises. No final do experimento os animais foram anestesiados com Cetamina 100mg/Kg (Syntec – BR) e Xilazina 20mg/kg (Syntec) para coleta do lavado peritoneal (isolamento dos macrófagos), e do sangue para realização de testes Bioquímicos e Hemograma (Tubo de coleta a vácuo com EDTA K3 [DB]). Posteriormente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical seguido da coleta dos órgãos e tumor, os quais foram pesados e fixados com solução Fekete [58% de etanol 95% (Merck – DE); 8% de formaldeído 37% (Synth – BR); 4% de ácido acético glacial (Dinâmica – Dinâmica química contemporânea, BR); 22% de água destilada] para posterior processamento histológico. Para o pulmão, foi realizada a quantificação da área de metástase por meio de análise de imagem (software ImageJ). Parte do tumor e do pulmão foram preservadas em meio DMEM (Gibco) com soro fetal bovino (Sigma) a 7°C overnight para realizar a imunofenotipagem e quantificação de citocinas. A Figura 5 apresenta um esquema experimental de todo o procedimento.

Figura 5: Esquema experimental *in vivo*.

FONTE: O autor (2023).

CRÉDITOS: Biorander.

3.5 ISOLAMENTO DE MACRÓFAGOS DO LAVADO PERITONEAL

Para isolamento dos macrófagos do lavado peritoneal foi seguido o protocolo de Pineda-torra e colaboradores (2015) e De Oliveirae colaboradores (2011). Assim, os camundongos C57BL/6 foram anestesiados, e após a exposição da região peritoneal, foi inserido 5 mL de PBS gelado com seringa de 10 mL e agulha (calibre 25) no peritônio do animal. Após massagear a área foi retirado o conteúdo cautelosamente para não perfurar o peritônio. O lavado foi mantido em tubo de centrifugação de 15 mL e armazenado em gelo. Após a coleta o material foi centrifugado por 8 min, 1800 RPM e ressuspendido em 5 mL de meio RPMI (Gibco) com 10% de soro fetal bovino (Sigma) inativado e 0,25 µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina (Gibco). Foi realizada de contagem diferencial em Câmara de Neubauer empregando o corante Azul de Tripán (Sigma) e plaqueadas 2x10⁶ células/poço em placa de 6 poços e 1x10⁵ células/poço em placas de 96 poços (Sarstedt) e mantidas em incubadora umidificada com 5% CO₂ a 37°C por 24h. Após esse período as células foram expostas os compostos GGHS e GGH a 100 µg/mL por 72 horas ou não (grupo controle – meio RPMI não contendo soro fetal bovino). Após

esse período foi realizado o procedimento para quantificação de espécies reativas de oxigênio e citocinas respectivamente.

3.6 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO TUMOR E PULMÃO.

Para obtenção das células do tumor e pulmão foi seguido o protocolo de YU e colaboradores (2016). Assim, após a coleta os pulmões e tumores foram mantidos e meio DMEM (Gibco) com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma) a 7°C overnight em placa de 24 poços (Sarstedt). No dia seguinte, esses foram cortados em pedaços menores com auxílio de uma tesoura e posteriormente expostos a 2mL de solução de digestão [1,5 mg/ml de collagenase de *Clostridium histolyicum* (Sigma) 5% de soro fetal bovino (Sigma) inativado; 10mM HEPES (Sigma) em HBSS] por 45 minutos em banho maria a 37°C. Após o período, as amostras foram homogeneizadas vagarosamente e centrifugadas para remoção da solução de digestão por 5 minutos a 1800 RPM. Em seguida, as amostras foram passadas por *cell strainer* 70 µm (Corning, EUA) e expostas a 2mL a tampão de lise de células vermelhas (RBC) (1x) (eBioscience, EUA) por 5 minutos em gelo e foram centrifugadas a 1800 RPM por 5 minutos e ressuspensas em 2 mL de PBS para posterior processamento para imunofenotipagem.

Para a quantificação de citocinas presentes no pulmão e tumor, ambos foram diretamente passados em meio DMEM (Gibco) com 10% de soro fetal bovino (Sigma) inativado por *cell strainer* 70 µm (Corning), aliqüotados em 2 mL em microtubos e centrifugados em microcentrífuga a 17000 RPM por 3 minutos e coletado o sobrenadante para posterior processamento de quantificação de citocinas.

3.7 ISOLAMENTO E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA

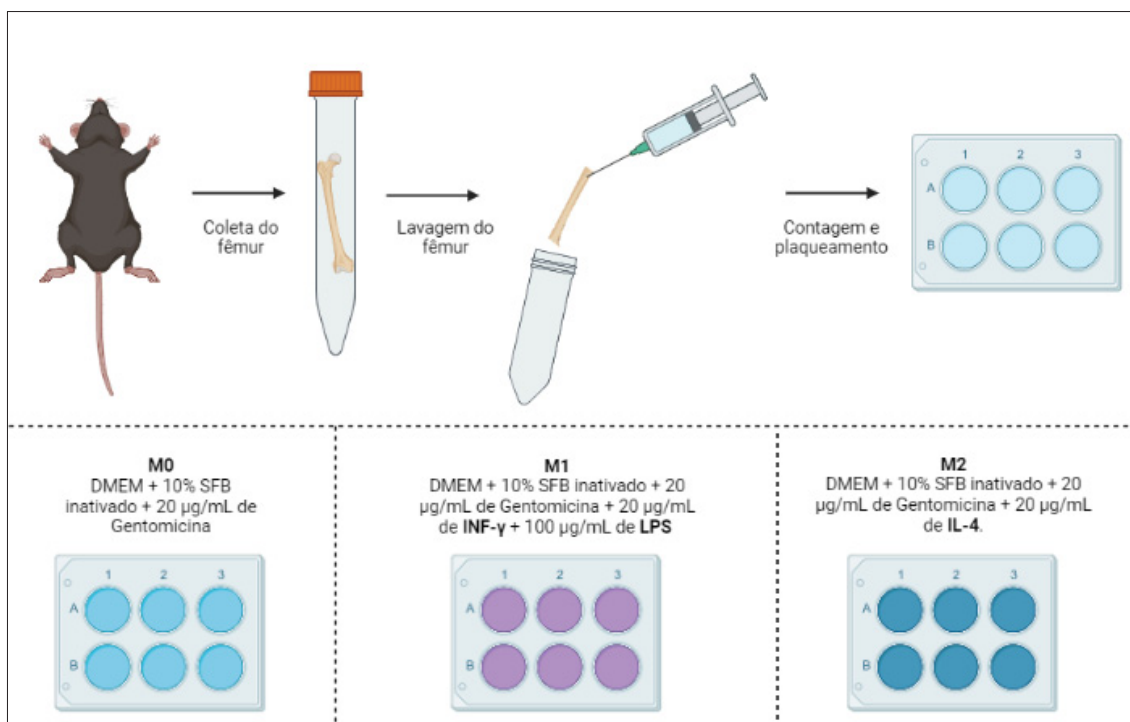
Para isolamento dos macrófagos da medula óssea foi seguido o protocolo de Pineda-torra e colaboradores (2015). Assim, camundongos machos C57BL/6 (n=5) que não receberam inoculação de células B16-F10 nem tratamento foram anestesiados e eutanasiados para coleta dos fêmures e mantidos em PBS estéril gelado. Após a coleta foram levados para fluxo laminar e retiradas ambas as epífises. Foi inserido 5 mL de PBS estéril com agulha de calibre 25 no eixo do fêmur e coletado

em um tubo de centrifugação cônico de 50 mL estéril (Corning). Após a lavagem o material foi centrifugado por 5 min à temperatura ambiente a 1800 RPM.

Após a centrifugação o *pellet* foi ressuscitado em 500 µL de tampão de lise RBC (1x) (eBioscience) em gelo por 5 min. Foram adicionados 2 mL de meio de diferenciação [DMEM (Gibco) + 20 % soro fetal bovino inativado (Sigma) + 30 % LCM (meio condicionado da célula L929) + 20 µg/mL gentamicina (Gibco)] a temperatura ambiente e depois centrifugado. Foi realizado a contagem e 6×10^6 células foram plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt) com 8 mL de meio de diferenciação. As células foram mantidas por 7 dias em incubadora umidificada com 5% CO₂ a 37°C, sendo que no 5º dia o meio foi trocado.

No 7º dia de cultura, as células foram desaderidas com *cell scraper* (Sarstedt) contadas em Câmara de Neubauer empregando o corante Azul de Tripán (Sigma) e 2×10^6 células foram plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt). Para a polarização M1 foi utilizado um meio contendo 10% de soro fetal bovino (Sigma) inativado, 20 µg/mL gentamicina (Gibco), 20 ng/mL IFN γ (Invitrogen, EUA), 100 ng/mL of LPS (Sigma-Aldrich, EUA). Para polarização M2 foi utilizado um meio contendo 10% de soro fetal bovino (Sigma) inativado 20 µg/mL gentamicina (Gibco) e 20 ng/mL IL-4 (Miltenyi Biotec, DE). As células M0 foram mantidas em meio DMEM (Gibco) com 10% de soro fetal bovino (Sigma) inativado e 20 µg/mL gentamicina (Gibco). Para polarização M1 e M2 às células foram mantidas por 48 horas em incubadora umidificada com 5% CO₂ a 37°C. A figura 6 apresenta um esquema de como foi realizado o procedimento. Após esse período as células foram expostas aos compostos GGHS e GGH a 100 µg/mL por 72h. Após esse período, as células foram processadas para imunofenotipagem.

Figura 6: Esquema experimental de isolamento e polarização de macrófagos da medula óssea.



FONTE: O autor (2023).

CRÉDITOS: Biorender.

3.8 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para analisar o perfil dos macrófagos presentes nas amostras de pulmão, tumor e macrófagos derivados da medula óssea prosseguiu-se para imunomarcagem das amostras após o processamento. Assim para o perfil de macrófagos M1 foram utilizados os anticorpos CD80 (PerCP eFlour 710 – Invitrogen) e CD86 (APC – Invitrogen) e para perfil de macrófagos M2 foram utilizados os anticorpos CD206 (Alexea fluor 488 – Invitrogen) e CD163 (PE – Invitrogen). Para a marcação da população geral de macrófagos foi utilizado o anticorpo F4/80 (ACP eFlour 780 - Invitrogen).

Para analisar o perfil de linfócitos presentes nas amostras de pulmão e tumor foram utilizados os anticorpos CD4 (PE – Invitrogen) e CD25 (FITC – Invitrogen) para marcação de linfócitos T regulatórios; CD8 (PE – Invitrogen) para marcação de linfócitos T citotóxicos; e CD3 (PerCP cy 5.5 – Invitrogen) para marcação da população geral de linfócitos.

Assim, as células foram passadas para tubos de citometria 12 mm x 75 e incubadas com 20 µL de CD16/CD32 (Invitrogen) em um volume final de 100 µL por

10 minutos antes da marcação com anticorpo. Após esse período as células foram centrifugadas e ressuspensas em 50 µL contendo os anticorpos F4/80; CD80 e CD86 em PBS/Albumina bovina (BSA) 1% (Sigma) por 50 minutos no gelo. Após o período de incubação foram adicionados 500 µL de PBS nas amostras e centrifugadas a 1800 RPM por 5 minutos em temperatura ambiente. Depois as células foram fixadas com 100 µL de paraformaldeído [(PFA) Sinth] 2% por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após fixar as células foram adicionados 100 µL de tampão de permeabilização [PBS + BSA 1% (Sigma) + saponina 0,01%(Sigma)] e posterior centrifugação a 1800 RPM por 5 minutos. Depois de repetir o processo anterior as amostras foram ressuspensas em 50 µL de tampão de permeabilização contendo os anticorpos CD206 e CD163 por 50 minutos. Após foram adicionados 500 µL de PBS e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Por fim as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS e mantidas a 7°C até a obtenção de dados.

Os dados foram obtidos no citômetro de fluxo FACS Melody (BD) no canal de laser adequado, com 50.000 eventos para cada amostra de pulmão e tumor, e 8.000 eventos para macrófagos da medula óssea. A análise dos dados foi feita através do software Flowjo.

3.9 ENSAIO DE DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Para quantificar as espécies reativas de oxigênio em macrófagos extraídos do lavado peritoneal, foi empregada a sonda fluorescente DCFH-DA (Sigma). Após o plaqueamento e exposição das dessas células pelos compostos GGH e GGHS (100 µg/mL, 72h) foi retirado o meio de cultura das placas de 6 poços (Sarstedt) e lavadas com HBSS. Depois as células foram expostas a 1 mL da sonda DCF-DA na concentração de 10uM em HBSS por 30 minutos a 37° C e 5% CO₂. Após o período de incubação as células foram soltas das placas por meio do *cell scraper* (Sarstedt) e passadas para tubos de citometria 12 mm x 75. Os dados foram obtidos no citômetro de fluxo FACS Melody (BD) no canal de laser adequado, com 8000 eventos para cada amostra. A análise dos dados foi feita através do software *Flowjo*.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para quantificar as citocinas presentes no pulmão, tumor e sobrenadante de macrófagos do lavado peritoneal foi utilizado o kit BD *Cytometric Bead Array* (CBA) *Mouse Inflammation*, contendo as seguintes citocinas: Interleucina-6 (IL-6); Interleucina-10 (IL-10); Proteína Quimioatraente de Monócitos-1 (MCP-1); Interferon- γ (IFN- γ); Fator de Necrose Tumoral (TNF) e proteína Interleucina-12p70 (IL-12p70).

Os dados foram obtidos no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD), utilizando o software CellQuest (BD) com 2100 eventos para cada amostra. A análise dos dados foi feita através do software FACSArray (BD).

3.11 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA

Para as análises histológicas, os tumores e pulmões fixados foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Posteriormente foram realizados cortes histológicos de 5 μ m em micrótomo e depositados em lâminas para a realização de técnicas de coloração como hematoxilina e eosina (HE). Por fim as lâminas permanentes foram montadas com Entellan (Merck) (CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014). As imagens do material foram adquiridas utilizando o Scanner de Lâminas Histológicas (modelo Vslider, Carl Zeiss/Metasystems).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism V.6.01. Para análise estatística dos dados foi realizado inicialmente teste de identificação de *outliers* pelo método de ROUT nas amostras. Quando identificados, esses foram retirados das análises. Assim foi utilizado o teste ANOVA one-way não paramétrico com comparação de Dunn. Para a comparação estatística da progressão tumoral foram utilizados o teste ANOVA two-way com pós-teste de Dunnett. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças entre grupos com o nível de significância de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE PROLIFERATIVA SOBRE LINFÓCITOS *IN VITRO* DE GGHS E GGH

A infiltração de linfócitos T na massa tumoral é de extrema relevância para a contenção do desenvolvimento do melanoma e aumento da sobrevida de pacientes (CLARK *et al.*, 1989; DUDLEY *et al.*, 2001). Diante disso, a importância de se obter uma quantidade considerável dessas células durante a progressão da doença é um grande foco de estudo para guiar uma abordagem de tratamento para o melanoma (LIU; SUN, 2021). Além disso, o melanoma é um dos cânceres mais imunogênicos, tendo grande potencial para um tratamento via sistema imune (KIRKIN *et al.*, 1998). Assim, compostos que tem a capacidade de levar esse aumento de infiltrado no tumor são alvos de estudos (LI *et al.*, 2021).

Um primeiro passo para verificar a atividade do composto sobre os linfócitos T seria avaliar o potencial proliferativo sobre essas células. Assim o ensaio de proliferação celular de linfócitos T foi realizado pela marcação das células com Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE). O CFSE liga-se covalentemente à moléculas intracelulares, então quando uma célula marcada se divide, suas células filhas têm metade da quantidade de fluorescência, o que pode ser usada para avaliar a divisão celular.

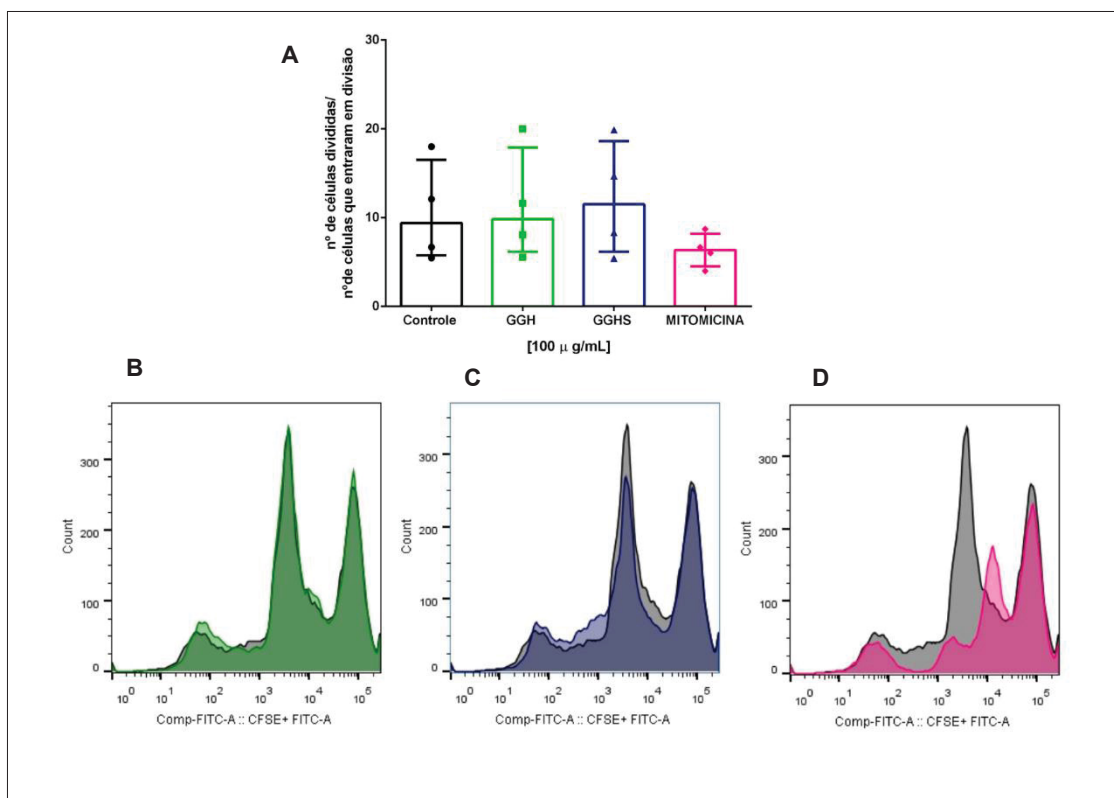
Esse ensaio foi realizado no intuito de verificar se os compostos possuem atividade proliferativa direta sobre células de linfócitos T, pois, como visto anteriormente, essas células são de grande importância para a regressão tumoral. Na Figura 7 podemos observar que GGH e GGHS (100 µg/ml) não alteraram o perfil de proliferação de linfócitos T (JURKAT). A mitomicina (5 µM) foi utilizada como controle de inibição de proliferação (controle negativo do experimento). Assim, podemos concluir que esses compostos não são capazes de estimular a proliferação de celular de linfócitos T *in vitro* sob essas condições.

De acordo com a literatura pouco se sabe sobre o efeito de galactomananas e principalmente as modificadas com sulfatação, em linfócitos T. Essa atividade biológica está intimamente relacionada à sua estrutura molecular, ou seja, diferenças estruturais, peso molecular e composição podem afetar o potencial imunoestimulatório do polissacarídeo (TAO *et al.*, 2021; WASSER, 2002). Em um estudo realizado por Leung e colaboradores, 2004 avaliou-se o efeito imunoestimulatório de diferentes

polissacarídeos extraídos da *Aloe vera* L. var. *chinensis*. Dentre esses polissacarídeos, o denominado PAC – I, que apresenta em sua estrutura principal manose β -(1 $\rightarrow$ 4), assim como GGH E GGHS, apresentou efeito proliferativo em linfócitos T isolados do baço de camundongos BALB/c *in vitro* de forma concentração dependente (100 – 500 μ g/mL). Por outro lado, um estudo realizado por Simões e colaboradores, 2009 demonstrou o efeito imunoestimulatório em linfócitos T isolados do baço de camundongos C57BL/6 de diferentes polissacarídeos extraídos do café brasileiro arábico, *Aloe vera* e *Ceratonia siliqua*. Assim, dentre esses polissacarídeos, a galactomanana extraída da *Ceratonia siliqua*, denominado LBG, com mesma estrutura molecular de GGH mas, peso molecular diferente (50-100 kD) não apresentou efeito de proliferação nessas células *in vivo* (25 μ g/mL).

Além desse efeito direto sobre linfócitos T, um estudo demonstrou que células dendríticas, após serem tratadas com uma galactomanana extraída da *Caesalpinia spinosa* (7 e 21 μ g/mL), conseguiram estimular a proliferação de linfócitos T *in vitro*, ambas células extraídas do sangue de doadores humanos saudáveis (SANTANDER *et al.*, 2011).

Figura 7: Proliferação de linfócitos T.



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos *in vitro* sobre o ensaio de proliferação celular de linfócitos T (JURKAT). (A) O gráfico representa o índice de replicação (nº de células divididas

pelo nº de células que entraram em divisão). Os gráficos histograma de (B) GGH 100µg/ml; (C) GGHS 100µg/ml e (D) Mitomicina 5µM pelo controle (meio RPMI – em cinza). Os gráficos demonstram a média com desvio padrão de quatro plicas de quatro experimentos biológicos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste de ANOVA one-way ($p < 0,005$).

Apesar dos resultados apresentados nesse trabalho não demonstrarem aumento da proliferação de linfócitos T (JURKAT) *in vitro* por GGH e GGHS, a infiltração dessas células no tumor não se dá apenas pela correlação direta com a proliferação dessas células. Esse processo está correlacionado também com as citocinas presentes no ambiente tumoral e adesão das células à moléculas dos vasos sanguíneos no local (RAHIR; MOSER, 2012). Assim, os compostos podem ainda apresentar esse efeito de recrutamento das células por essas vias.

Ainda esses compostos podem ter grande potencial na ativação dessas células, bem como um efeito de aumento de linfócitos infiltrados no tumor e no sangue *in vivo*. Além disso os compostos podem ter atividade imunoestimulatória em outras células do sistema imune, como os macrófagos, sendo alvo de estudo nas próximas etapas do trabalho.

4.2 AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA DE MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA DE GGHS E GGH

Além dos linfócitos, os macrófagos têm um importante papel na progressão e desenvolvimento do melanoma, dependendo do seu perfil (HUSSEIN; HUSSEIN MSCPATH, 2006). Os macrófagos M1 são caracterizados pela expressão de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias; regulação positiva das moléculas da superfície celular necessárias para a apresentação do antígeno, sendo elas MHC II, CD80 e CD86; e forte potencial antitumoral. Em contraste, os macrófagos M2 estão envolvidos na promoção da remodelação tecidual e progressão tumoral, na produção das citocinas imunossupressoras e a regulação CD206 e CD163 (LÓPEZ-JANEIRO *et al.*, 2020; MIGNOGNA *et al.*, 2017). Assim em um contexto tumoral, o perfil de macrófago M1 é mais favorável ao paciente e por isso é o alvo de estudo.

Há diferentes abordagens de estudos para verificar a ação imunoestimulatória de um composto. Neste trabalho, para verificar se os polissacarídeos têm esse efeito em macrófagos, foi realizado o ensaio de imunofenotipagem de macrófagos da medula óssea, analisando assim o perfil de ativação dessas células (M1 ou M2) frente aos compostos GGHS e GGH. A análise realizada está demonstrada no Anexo 1.

Como podemos observar na figura 8A ambos os compostos apresentam maiores porcentagens de marcadores para perfil M1 (CD80 e CD86) em relação ao grupo controle. No entanto, o composto GGH apresentou maior potencial em relação a GGHS. Além disso, ambos compostos apresentaram porcentagem de células marcadas para o perfil M2 (CD163 e CD206) inferior em relação ao controle. Assim, os compostos estimulam macrófagos M0 mais para um perfil M1 do que M2 e o GGH tem um maior potencial em relação a GGHS.

Além disso, podemos observar que os compostos não alteram o perfil de macrófagos já polarizados para o perfil M1 (Figura 8B), porém em macrófagos já polarizados para o perfil M2 há redução da porcentagem de células com marcadores desse perfil em relação ao controle (Figura 8C).

Por fim, podemos observar que a razão de células M1/M2 para os perfis de macrófagos M0 e M2 tratados com os compostos GGH e GGHS apresentaram mais células com perfil M1 em relação ao controle. Vale ressaltar que valores ≤ 1 apresentam mais células com perfil M1; valor = 1 há a mesma quantidade de células com perfil M1 e M2; e valores ≥ 1 apresentam mais células com perfil M2. Não houve diferença com relação as células que já apresentavam perfil M1 (Figura 8D).

Com esses resultados podemos inferir que ambos os compostos apresentaram efeito imunoestimulatório favorecendo o perfil M1 de macrófagos. De fato, diversos polissacarídeos apresentam efeito modulador no sistema imune e em específico nos macrófagos (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Um estudo realizado por Kumari e colaboradores, 2019 demonstrou que uma nanopartícula funcionalizada com uma galactomanana reduziu a expressão de marcadores CD206 e Arginase-1 (marcadores de macrófagos M2) *in vitro* em macrófagos murinos RAW-264.7, já polarizados para perfil M2, na concentração de 62,1 $\mu\text{g/ml}$. Além disso esse complexo também reduziu a expressão de CD206 de macrófagos isolados de tumor de mama em camundongos swiss tratados intra-peritonealmente na dose de 75,8 mg/kg. Assim demonstraram o efeito imunomodulador do complexo de nanopartícula funcionalizada com galactomanana similar aos compostos de estudo desse trabalho.

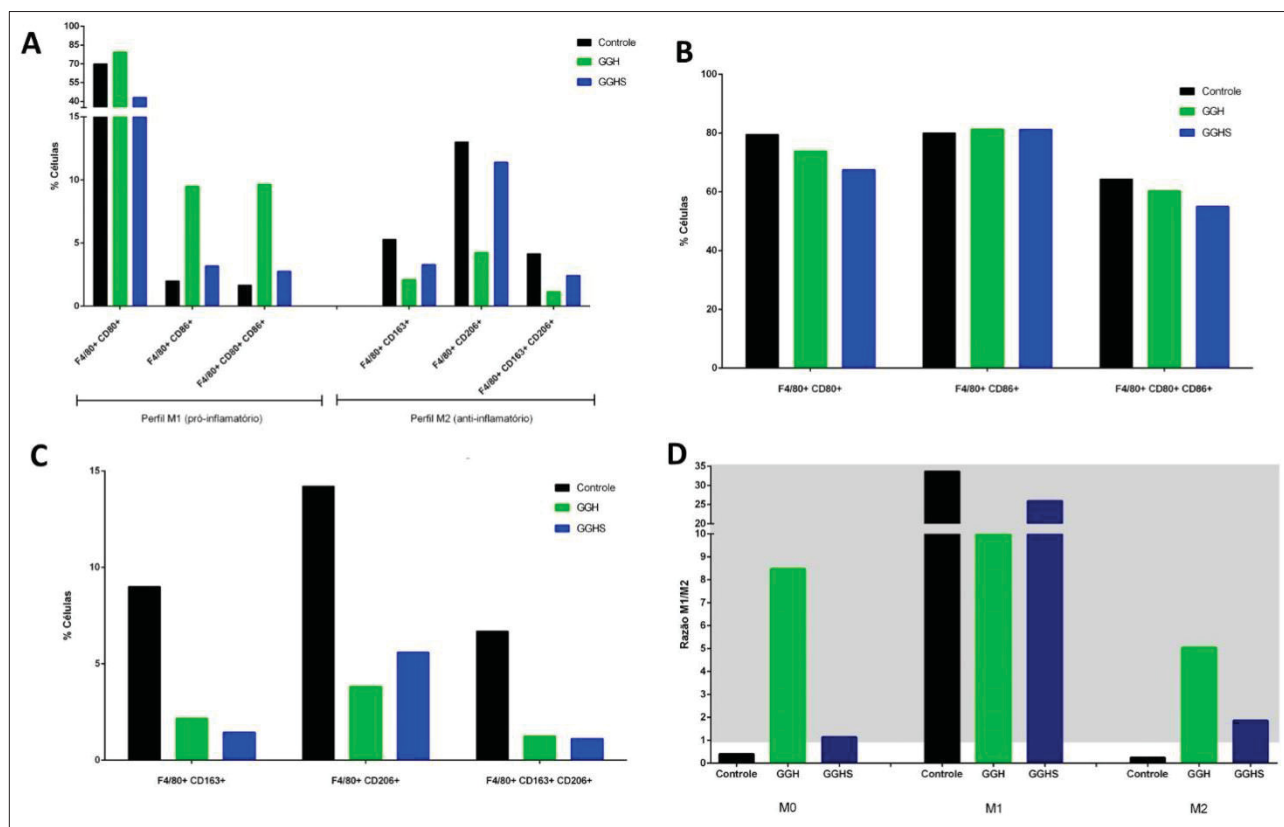
Kim e colaboradores, 2004 demonstraram que um polissacarídeo isolado do fungo *Phellinus linteus* (PL), composto principalmente por manose, glucose e galactose e de massa molecular de 15kDa, aumentou significativamente a expressão de marcadores CD80 e CD86 de macrófagos isolados do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ por 24h. Assim demonstraram

que o PL apresenta potencial imunomodulador para perfil M1 de macrófagos do lavado peritoneal.

Em um estudo realizado por Melo, 2015 foi possível observar o efeito imunomodulador do composto DAVANAT™ em macrófagos extraídos da medula óssea de camundongos murinos C57BL/6. De forma similar, após a extração e cultivo dos macrófagos, esses foram polarizados para perfil M1 e M2 ou não (M0). Após foram tratadas nas concentrações de 4; 20 e 100 µg/mL por 24h e quantificados a expressão de iNOS (Óxido Nitríco Sintetase) e IL-1b, expressos em macrófagos M1 e de CD206 e PPARγ (Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama), expressos em macrófagos M2. Assim, com relação a expressão dos marcadores para perfil M2 foi possível observar que não houve alteração de expressão aos grupos M0 e M1. Por outro lado, houve uma redução significativa da expressão desses genes no grupo M2 que foram expostos ao DAVANAT™ em relação ao controle. Com relação a expressão dos marcadores para perfil M1, não há uma diferença de expressão entre os grupos. Isso demonstrou que o composto tem uma ação de polarização para perfil M1 de macrófagos.

Dessa forma, esses estudos corroboram com os resultados apresentados nesse trabalho, apesar de diferentes abordagens, demonstraram o potencial imunomodulador de galactomananas que favorecem o perfil M1 de macrófagos.

Figura 8: Perfil dos macrófagos da medula óssea.



Fonte: o autor (2023)

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos a partir da imunofenotipagem de macrófagos derivados da medula óssea. Os gráficos representam a porcentagem de células marcadas de acordo com cada grupo de anticorpo do perfil de macrófagos, sendo em A os que não sofreram polarização, em B os que sofreram polarização para perfil M1 e em C os que sofreram polarização para perfil M2. Já o gráfico D representa a razão entre as células com polarização M1 (F4/80⁺ CD80⁺ CD86⁺) e M2 (F4/80⁺ CD163⁺ CD206⁺). A concentração utilizada para ambos os compostos foi de 100 µg/mL. Os gráficos demonstram a porcentagem de células obtidas de um *pool* de 5 animais de um experimento biológico. A análise estatística foi feita através do teste ANOVA one-way ($p < 0,05$).

Para averiguar o potencial efeito de GGH E GGHS em macrófagos ainda foram realizados outros experimentos, como quantificação de espécies reativas de oxigênio e quantificação de citocinas em sobrenadante de cultivo de macrófago.

4.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DE MACRÓFAGOS DO LAVADO PERITONEAL GGHS E GGH

Um dos parâmetros para análise de ativação dos macrófagos é a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) dessas células. A grande produção de ROS por macrófagos frente ao contato com patógenos serve como uma das primeiras linhas de defesa da resposta inata. Além disso, a grande quantidade de ROS presente no local aumenta a transdução de sinal de ativação dos linfócitos T, participando também

da resposta imune adquirida (ALFADDA; SALLAM, 2012). Assim, através desse método podemos analisar o potencial efeito dos compostos GGH e GGHS frente a essa célula do sistema imune. Dessa forma, foi realizado ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos derivados do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 que receberam células de melanoma murino. Para isso foi utilizado uma sonda lipofílica não fluorescente, que permite a detecção do status oxidativo geral da célula. No meio intracelular, a sonda é hidrolisada por esterases, gerando a molécula DCFH, a qual pode ser oxidada e formar o componente fluorescente 2',7' diclorofluoresceína (DCF), permitindo sua detecção e análise da fluorescência gerada.

Na figura 9A podemos observar que há duas populações distintas de células após serem expostos aos compostos de estudo. Uma população menor e menos complexa e uma população maior e mais complexa. Essas células foram quantificadas e na figura 9B podemos observar que em relação ao controle ambos os compostos estimulam as células para um perfil ativado, sendo estatisticamente significativo quando as células são expostas ao composto GGHS.

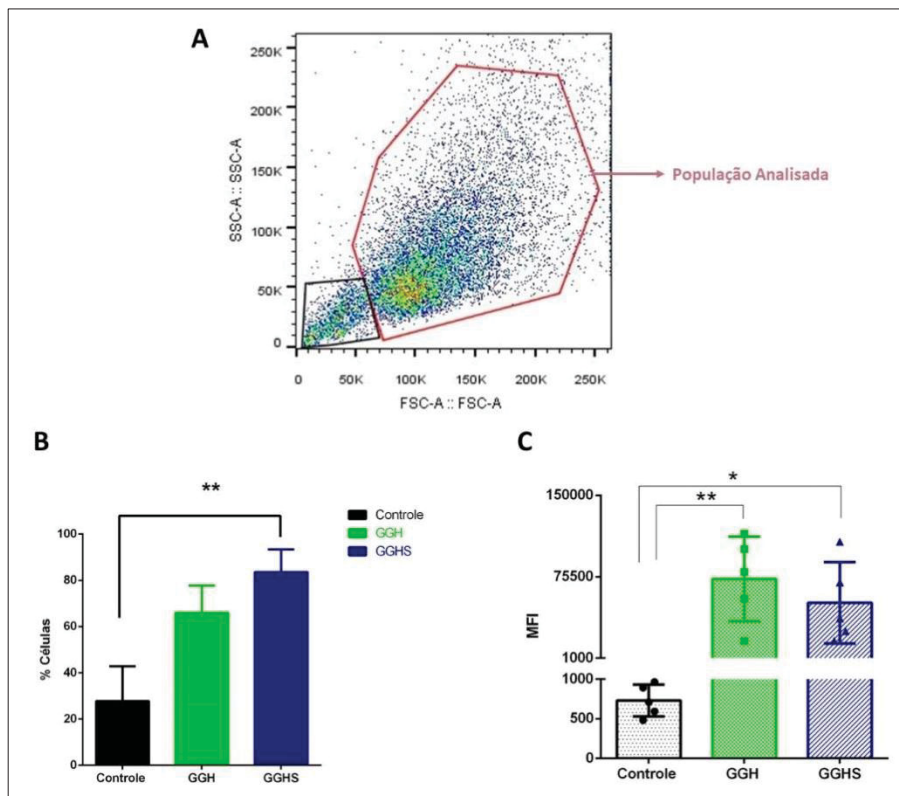
Com relação a quantificação da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da sonda podemos observar que as células expostas aos compostos apresentam maior MFI em relação ao controle, sendo estatisticamente significativo (Figura 9C).

Como visto anteriormente os compostos de estudo desse trabalho apresentaram atividade sobre macrófagos derivados da medula óssea levando-os ou mantendo-os em uma polarização para perfil M1. Agora observamos que GGH e GGHS estimulam a produção de ROS em macrófagos isolados do lavado peritoneal de camundongos, apurando ainda mais seu efeito sobre esse tipo celular.

Outros polissacarídeos com estrutura ou composição similares a esses compostos demonstraram o mesmo efeito sobre células de macrófagos. Shin, 2017 demonstrou que um polissacarídeo extraído de *Coffea arábica*, que apresenta em sua composição principalmente galactose e manose, aumentou a quantificação de espécies reativas de oxigênio em macrófagos do lavado peritoneal de camundongos BALB/C nas doses de 10; 100; 200; 500; 1000 µg/mL por 24h. Ainda, um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Caulerpa cupressoides*, que possui em sua composição principal galactose e manose, apresentou aumento significativo de quantificação de espécie reativa de oxigênio em macrófagos de linhagem RAW 264.7

na concentração de 800 µg/mL por 24h de exposição (DA SILVA BARBOSA *et al.*, 2019).

Figura 9: Espécies reativas de oxigênio de macrófagos da medula óssea.



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos com a detecção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos derivados do lavado peritoneal. (A) O gráfico representa as duas populações encontradas nas análises. (B) O gráfico representa a porcentagem de células presentes na população com perfil maior e mais granuloso (População Analisada) em cada grupo. (C) O gráfico representa a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) referente a população analisada da sonda DCF. A concentração utilizada de ambos os compostos foi de 100 µg/mL. Os gráficos demonstram a média com desvio padrão (Controle PBS n=5; GGH 5mg/kg n=5; GGHS 5mg/kg n=5). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one-way ($p < 0,05$).

Com isso, outro passo importante para averiguar a capacidade imunoestimulatória de GGH e GGHS é por meio da verificação das citocinas liberadas por macrófagos quando expostas aos compostos.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS DE MACRÓFAGOS DO LAVADO PERITONEAL

As citocinas produzidas no microambiente tumoral têm um papel importante no desenvolvimento do câncer, podendo inibir o desenvolvimento e a progressão do tumor ou promover o crescimento, atenuar a apoptose e facilitar a invasão e a

metástase (SANTANDER *et al.*, 2011). Dessa forma, para avaliar as citocinas liberadas pelos macrófagos, extraídos do lavado peritoneal de camundongos com melanoma, quando expostas aos compostos GGH e GGHS foi realizado o ensaio de quantificação de citocinas do sobrenadante das células por meio do kit CBA.

Na figura 10 podemos observar as citocinas quantificadas do sobrenadante do cultivo de macrófagos do lavado peritoneal (as outras citocinas presentes no kit não foram apresentadas pois não houve detecção por esse método). Assim podemos verificar aumento estatisticamente significativo da liberação de citocinas TNF e IL-6 no grupo GGH comparado ao grupo controle. Com relação a GGHS foi visto um aumento significativo apenas na citocina IL-6.

Essas duas citocinas tem função pró-inflamatórias, sendo produzidas principalmente por macrófagos ativados; elas medeiam múltiplos efeitos biológicos, incluindo a ativação de respostas imunes (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; SCHELLER *et al.*, 2011). No melanoma a citocina IL-6 tem papel dual em relação ao sistema imune e de inibição da progressão tumoral. Na literatura estudos demonstram que essa citocina quando presente no ambiente tumoral de melanoma pode levar a progressão tumoral e de metástase (HOEJBERG; BASTHOLT; SCHMIDT, 2012; NA *et al.*, 2013). Como também é demonstrado seu efeito imunoestimulatório e de redução da progressão tumoral em melanoma (ALASADY *et al.*, 2021). Há na literatura uma diversidade de galactomananas extraídas de fontes diferentes que aumentam a secreção de TNF e IL-6 *in vitro*.

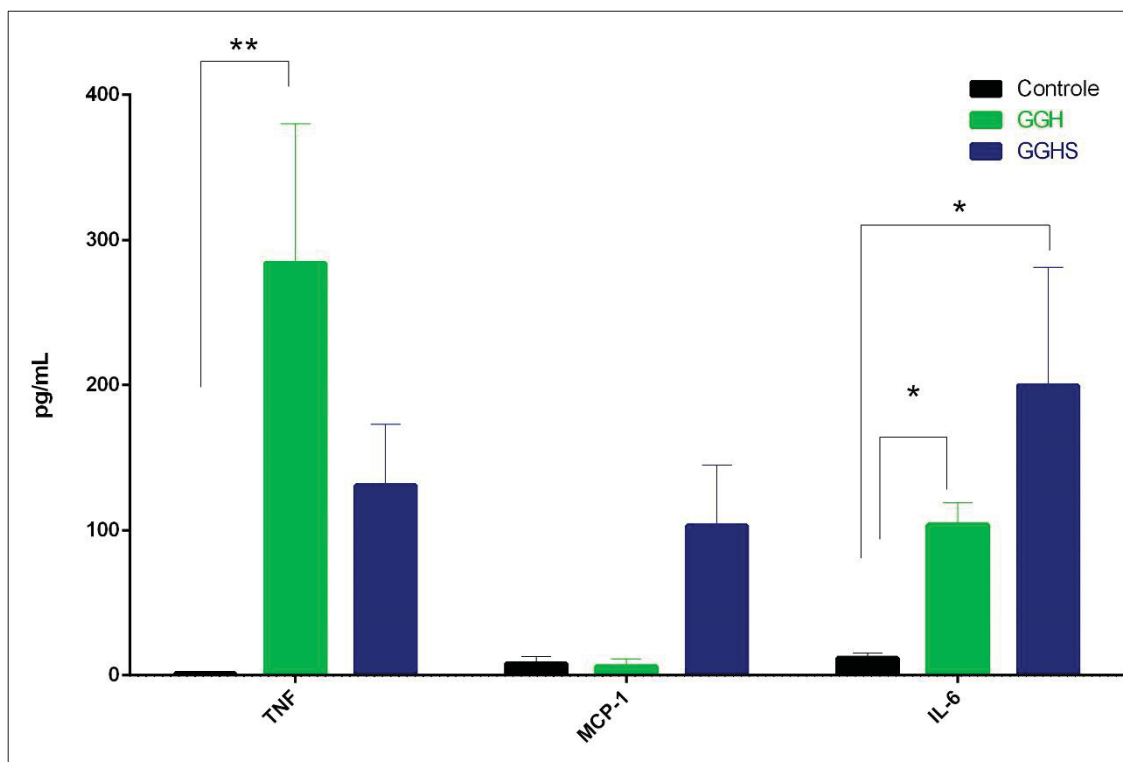
Um composto conjugado contendo galactomanana em sua composição aumentou a secreção de TNF em macrófagos de linhagem RAW 264.7 após a exposição por 24h a 500 µg/mL do composto (HA *et al.*, 2013). Chen e colaboradores, 2018 demonstraram também que uma galactomanana de *Ceratonia siliqua*, rica em manose (um dos monossacarídeos presentes em GGH e GGHS) aumentou significativamente a expressão de TNF em RAW 264.7 quando expostas as uma proporção de 0.05 – 0.2% do composto por 24h.

Outra galactomanana extraída de *Morchella esculenta* apresentou efeito imunoestimulador aumentando a secreção de TNF e IL-6 nas concentrações de 25, 100, 400 µg/mL em macrófagos de linhagem por 24h (ZHANG *et al.*, 2022). Assim, outro composto similar extraído de *Pleurotus eryngii* apresentou aumento significativo na liberação de TNF e IL-6 em macrófagos de murinos nas concentrações de 25; 50 e 100 µg/mL durante 24h de exposição (XU *et al.*, 2016). Curiosamente, uma

galactomanana extraída de *Aspergillus fumigatus* apresentou aumento de expressão de TNF e IL-6 de macrófagos RAW 264.7 nas concentrações de 10 e 100 µg/mL quando expostas por 24h, porém quando o tempo de exposição foi aumentado para 48h não foi visualizado esse mesmo efeito para expressão de TNF (PAULOVÍČOVÁ *et al.*, 2017).

Esses resultados demonstram que essa classe de polissacarídeos apresenta efeitos imunoestimulatórios em macrófagos por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6, que têm um papel importante na atividade estimulatória e de recrutamento de células imunológicas no microambiente tumoral.

Figura 10: Citocinas dos macrófagos do lavado peritoneal.



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: O gráfico acima representa os resultados obtidos com a quantificação de citocinas liberadas pelos macrófagos derivados do lavado peritoneal. Está representada a concentração em pg/mL das citocinas presentes no sobrenadante de cultivo dos macrófagos peritoneais (Controle PBS n=5; GGH 5mg/kg n=5; GGHS 5mg/kg n=5) com a média com desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one-way ($p < 0,05$).

Em conjunto, GGH E GGHS estimulam macrófagos extraídos tanto da medula óssea quanto do lavado peritoneal de camundongos murino por meio do aumento de marcadores para perfil M1, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de TNF e IL-6. Ainda podemos correlacionar que GGH teve um aumento nos marcadores de macrófagos M1 maior que GGHS por GGH expressar um aumento

significativo da citocina TNF, que tem função polarizadora para esse perfil mais antitumoral de macrófago.

Agora, com os resultados *in vitro* e *ex vivo* do efeito de GGH e GGHS sobre linfócitos e macrófagos, o próximo passo foi analisar essa atividade imunoestimulatória *in vivo* em um contexto tumoral e de metástase experimental.

4.5 IMUNOFENOTIPAGEM E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS GGHS E GGH DO PULMÃO DE CAMUNDONGOS COM METÁSTASE EXPERIMENTAL E TUMOR SÓLIDO.

No melanoma, o infiltrado de células de sistema imune no tumor e as citocinas presentes nesse contexto tem um papel crucial no desenvolvimento da doença (LÁZÁR-MOLNÁR *et al.*, 2000). Dessa forma é de extrema relevância verificar se os compostos levavam à algum tipo de resposta imunológica agora *in vivo* em um contexto de metástase experimental e tumor sólido. Assim foram realizados os experimentos de quantificação de citocinas e imunofenotipagem (painel de linfócitos) local. Vale ressaltar que foi realizado um experimento de triagem para escolher a melhor dose para prosseguir com análises mais aprofundadas (dados não apresentados), visto que seria a primeira vez que os compostos seriam expostos a camundongos nessas condições experimentais. Assim foi escolhida a dose de 5 mg/kg para ambos os compostos.

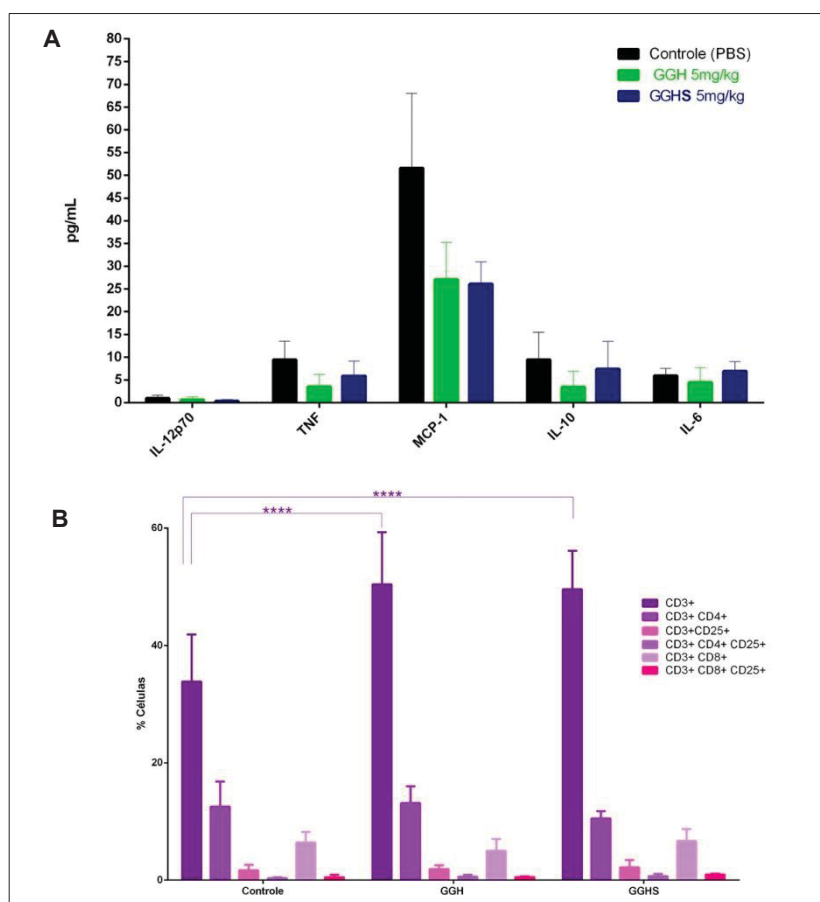
Nesse contexto, podemos observar que com relação a quantificação de citocinas, para todas as que foram detectadas experimentalmente, não há uma diferença significativa entre os grupos de tratamento tanto no pulmão quanto no tumor (FIGURA 11A e FIGURA 12A). É importante destacar que uma análise foi realizada utilizando os dados de quantificação de citocinas, que foram normalizados em relação à área de metástase pulmonar e ao volume tumoral. Contudo, de maneira semelhante, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle (dados não mostrados). No entanto, com relação à imunofenotipagem, podemos observar diferença significativa entre os grupos de tratamento e o controle para a porcentagem de células CD3⁺, indicando aumento da população de linfócitos T apenas no pulmão metastizado (Figura 11B).

Com relação as citocinas detectadas tanto no pulmão quanto no tumor, podemos observar que, apesar de não ter diferença estatística, duas citocinas foram

detectadas em ambos os órgãos MCP-1 e IL-6. Quando comparado com os resultados obtidos *ex vivo* com macrófagos peritoneais, foi possível observar uma diminuição da detecção das citocinas TNF e IL-6. A diferença pode ser explicada pelo tempo de exposição dos compostos em cada situação, uma vez que as células foram expostas diretamente aos compostos no experimento *ex vivo*, enquanto no *in vivo* eles são disseminados sistemicamente. Além disso, Paulovičová e colaboradores, 2017 demonstraram que uma galactomanana de *Aspergillus fumigatus* aumentou a expressão de TNF e IL-6 em macrófagos RAW 264.7 após 24 horas, mas não após 48 horas de exposição. Assim, no experimento *in vivo*, os animais foram expostos aos compostos por um período mais longo, podendo ter um efeito semelhante ao da galactomanana de *Aspergillus fumigatus*.

Apesar de MCP-1 do pulmão estar mais elevada no grupo controle, do que nos grupos expostos a GGH e GGHS, no tumor esses níveis apresentam-se semelhantes entre os grupos e no experimento *ex vivo* há um aumento de detecção dessa citocina em macrófagos tratado com GGHS. Koga e colaboradores, 2008 demonstraram que no melanoma essa citocina apresenta um papel pro-tumoral e pro-angiogênicos, comparado com seu inibidor em experimento de tumor sólido em camundongos murino. Por outro lado, essa citocina também é capaz de recrutar linfócitos intratumorais em modelo *in vivo* de tumor sólido de glioma (BROWN *et al.*, 2007).

Figura 11: Imunofenotipagem e quantificação de citocinas do pulmão.



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos da imunofenotipagem e quantificação de citocinas sobre o modelo de metástase pulmonar. (A) O gráfico representa a quantificação de citocinas presentes no pulmão metastático (Controle PBS n=5; GGH 5mg/kg n=5; GGHS 5mg/kg n=5). (B) O gráfico representa a porcentagem de células marcadas de acordo com cada grupo de anticorpo do perfil de linfócitos (Controle PBS n=5; GGH 5mg/kg n=5; GGHS 5mg/kg n=5). Os gráficos demonstram a média com desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one-way ($p < 0,05$).

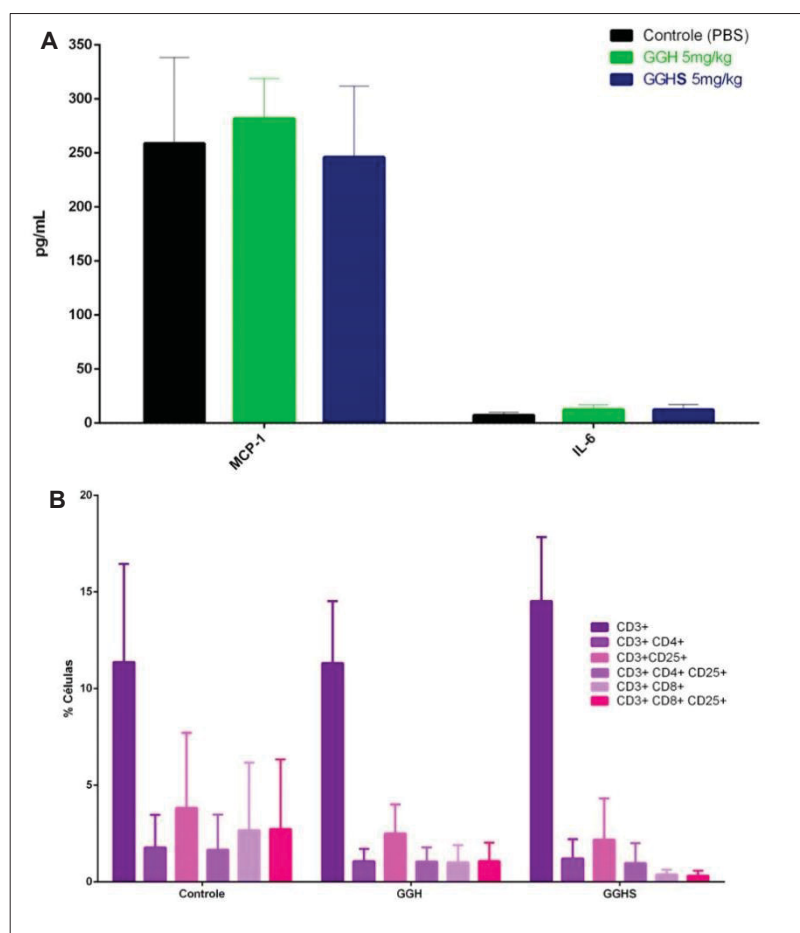
Com relação ao infiltrado de linfócitos, foi visto um aumento significativo de células CD3⁺ em pulmão metastizado nos grupos de tratamento de GGH e GGHS, que pode estar relacionado com outro fator que não o proliferativo, visto que *in vitro* os compostos não alteraram esse perfil de linfócitos de linhagem JURKAT. Outra galactomanana extraída e modificada de *Cyamopsis tetragonoloba*, mesma fonte de GGH, porém com peso molecular de 50kDa apresentou atividade imunoestimulatória em linfócitos infiltrados de tumor de pacientes de diferentes tipos de câncer (DEMOTTE *et al.*, 2014b). Além disso outra galactomanana sintética obtida através da nucleação de lactose e galactose, também apresentou atividade imuno-

estimulatória em linfócitos infiltrados de tumor de melanoma e que esse efeito pode estar ligado ao composto ser ligante de galectina-3 (DEMOTTE *et al.*, 2010).

Como visto anteriormente a galectina-3 tem um papel imunossupressor em linfócitos, por isso, um composto ligante de galectina-3 que iniba essa atividade, mesmo que indiretamente, aumentará a atividade biológica desses linfócitos no ambiente tumoral. Similarmente, foi visto que os compostos GGH e GGHS são potenciais ligantes de galectina-3, fazendo deles compostos que podem ser inibidores dessa galectina (BRAZ JUNIOR, 2020).

Tendo em vista que os compostos apresentaram grande potencial imunoestimulador *in vitro* e *in vivo* o próximo passo foi avaliar o efeito que esses compostos têm frente ao desenvolvimento tumoral e metástase experimental devido a todo contexto que envolve as células do sistema imune e tumor.

Figura 12: Imunofenotipagem e quantificação de citocinas do tumor.



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos da imunofenotipagem e quantificação de citocinas sobre o modelo de tumor sólido. (A) O gráfico representa a quantificação de citocinas presentes no tumor (Controle PBS n=5; GGH 5mg/kg n=5; GGHS 5mg/kg n=5). (B) O gráfico representa a porcentagem de células marcadas de acordo com cada grupo de anticorpo do perfil de linfócitos (Controle PBS n=5; GGH 5mg/kg n=5; GGHS 5mg/kg n=5). Os gráficos demonstram a média com desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one-way ($p < 0,05$).

4.6 VOLUME TUMORAL E ÁREA DE METÁSTASE GGHS E GGH.

Para analisar se os compostos GGHS e GGH possuem atividade antitumoral e antimetastática foi realizado o modelo experimental duplo (tumor sólido e colonização pulmonar, simultaneamente, no mesmo animal). Na literatura, essa estratégia experimental é utilizada para diferentes finalidades, como estudar o real efeito de quimioterápicos em um organismo que apresenta tanto um tumor sólido quanto focos metastáticos (CAISOVA *et al.*, 2019; KUDO-SAITO *et al.*, 2009, 2018; KUDO-SAITO; FUWA; KAWAKAMI, 2016), bem como compreender os efeitos de um modelo sobre o outro (KUBO *et al.*, 2017). Por fim, o modelo duplo de melanoma

acaba reduzindo a quantidade de animais, se comparado à realização dos dois modelos em separado e assim aprimorando o princípio dos três R's na experimentação animal.

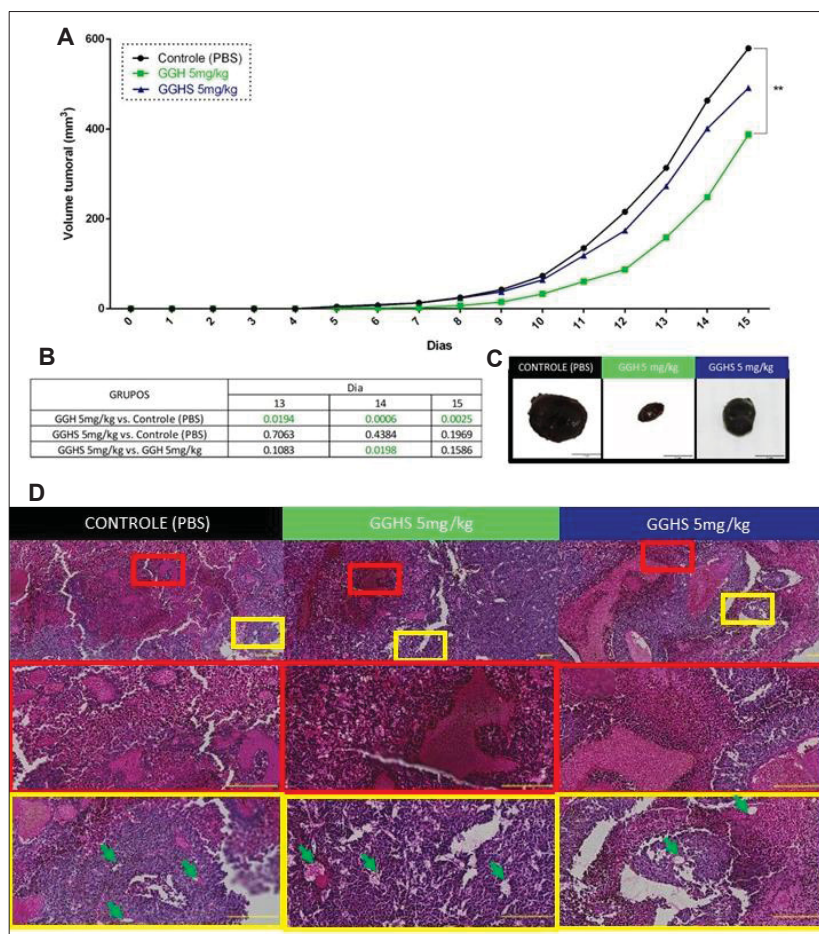
Na figura 13 observamos que apesar de apenas o composto GGH 5 mg/kg apresentar redução estatisticamente significativa do volume tumoral, ambos os compostos obtiveram volume tumoral menores em relação ao controle, ao longo dos dias de tratamento. Com relação a histologia foi possível observar que não há diferença entre os grupos de tratamento com relação a formação de vasos, mas a área de necrose tumoral é menor no grupo de tratamento GGH em relação ao controle (FIGURA 13D).

Com relação a metástase pulmonar podemos observar que GGH e GGHS tiveram uma redução na área de metástase 30.77% e 25.64% em relação ao controle (não estatístico). Na análise histológica podemos observar também, qualitativamente, que a área de metástase nos pulmões do grupo do tratamento GGH é menor do que o controle (FIGURA 14).

Para observar se os compostos de estudo apresentam algum efeito colateral nos animais, também foram comparados o peso dos órgãos e realizadas análises do sangue dos animais. Com relação aos parâmetros anatômicos, descritos na Tabela 1, podemos observar que não há nenhuma diferença estatística entre o peso dos órgãos e tumor dos animais.

Com relação aos exames de sangue podemos observar que não há diferença estatística com relação aos parâmetros bioquímicos (Tabela 2), eritrocitários (Tabela 3), leucocitários (Tabela 4) e plaquetário (Tabela 5). Vale ressaltar que os resultados bioquímicos e hematológicos foram comparados de acordo com os trabalhos de Silva *et al.*, 2012; Spinelli *et al.*, 2012 e Santos *et al.*, 2016, ou seja, os parâmetros analisados neste trabalho também foram comparados com padrões de animais C57BL/6 machos saudáveis (sem indução de tumores e/ou tratamento).

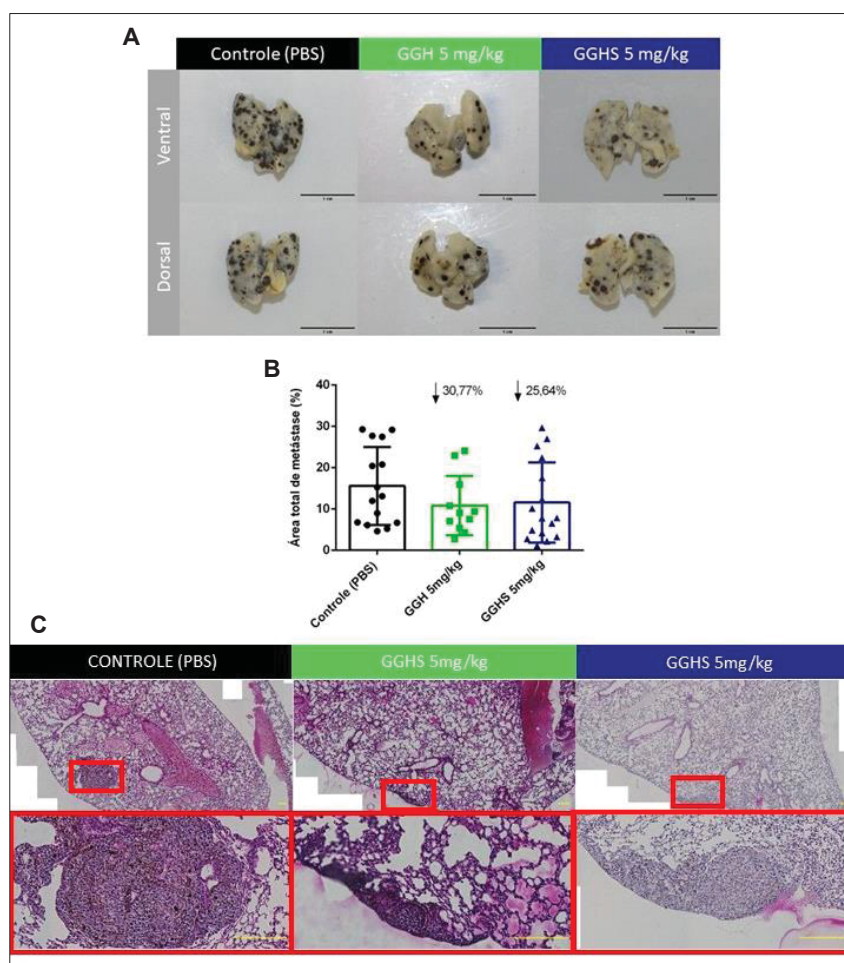
Figura 13: Volume tumoral e histologia GGHS E GGH.



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos *in vivo* de tumor sólido. (A) O gráfico representa a média do volume tumoral (mm³) ao longo do tempo de tratamento (Controle PBS n=16; GGH 5mg/kg n=11; GGHS 5mg/kg n=17). (B) A tabela representa os valores de p ao longo dos dias. (C) Imagens representativas da mediana dos tumores de cada grupo. A escala representa 1 cm (D) Imagens representativas dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina realizadas em escâner de lâminas (Metasystem/Carl Zeiss), sendo as caixas em vermelho da segunda linha representam a ampliação da área de necrose tumoral presente na primeira linha, enquanto as caixas em amarelo da terceira linha correspondem à ampliação da área destacada na primeira linha, que indica a mimetização de vasos, conforme indicado pela seta em verde. A escala representa 200 µm. Os dados representam três experimentos biológicos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA two-way (p<0,05).

Figura 14: Área de metástase pulmonar e histologia GGHS e GGH



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos *in vivo* sobre o modelo de metástase pulmonar. (A) Imagens representativas da média dos pulmões de cada grupo. A escala representa 1 cm. (B) O gráfico representa a porcentagem de metástase do somatório dos dois planos dos pulmões (ventral e dorsal) (Controle PBS n=15; GGH 5mg/kg n=11; GGHS 5mg/kg n=16). (C) Imagens representativas dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina realizadas em escâner de lâminas (Metasystem/Carl Zeiss), sendo as caixas em vermelho da segunda linha representam a ampliação da área de nódulo tumoral presente na primeira linha. A escala representa 200 µm. O gráfico demonstra a média com desvio padrão de dois experimentos biológicos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one-way ($p < 0,05$).

Tabela 1: Peso dos órgãos *in vivo* GGHS e GGH.

Grupo experimental	Peso dos órgãos (g)					
	Rins	Fígado	Coração	Baço	Pulmão	Tumor
Controle (PBS)	1,39 ± 0,06	5,35 ± 0,30	0,54 ± 0,08	0,36 ± 0,04	0,81 ± 0,11	1,86 ± 1,61
GGH 5 mg/kg	1,43 ± 0,03	5,35 ± 0,34	0,52 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,84 ± 0,11	1,32 ± 0,91
GGHS 5 mg/kg	1,43 ± 0,10	5,35 ± 0,10	0,52 ± 0,02	0,39 ± 0,05	0,78 ± 0,11	2,16 ± 1,49

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Foi empregado o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0,05$).

Segundo os resultados obtidos *in vitro* com esses compostos nas células de melanoma B16-F10 foi observada redução de características de malignidade como migração, invasão e tamanho de formação de colônia. Diferentemente, apenas GGHS apresentou alteração no ciclo celular, uma redução de 15% nas células presentes na fase G0/G1 e dessa forma impedindo a progressão do ciclo celular (todos os resultados foram obtidos a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$). Dessa forma, esperava-se que ambos os compostos fossem capazes de reduzir o volume tumoral *in vivo* e em especial GGHS pela sua atuação no ciclo celular (BRAZ JUNIOR, 2020). No entanto, esse efeito não foi observado para esse último composto. Visto que esse composto também apresenta atividade antitrombótica, um comparativo com outro composto com mesma atividade é apresentado no item 4.7 deste trabalho.

Em estudo realizado por Melo, 2015 demonstrou o potencial efeito antimelanoma *in vivo* de dois inibidores de galectinas, GR-MD-02 e DAVANAT™, sendo esse último uma galactomanana de estrutura similar ao composto GGH desse estudo. Assim, foi observado que o DAVANAT™ (51 kDa) diminuiu a progressão tumoral *in vivo*, em relação ao grupo controle, de melanoma murino na dose de 30 mg/kg por 11 dias. Dessa forma, de maneira similar com o presente estudo, os resultados demonstram o grande potencial antimelanoma que as galactomananas apresentam.

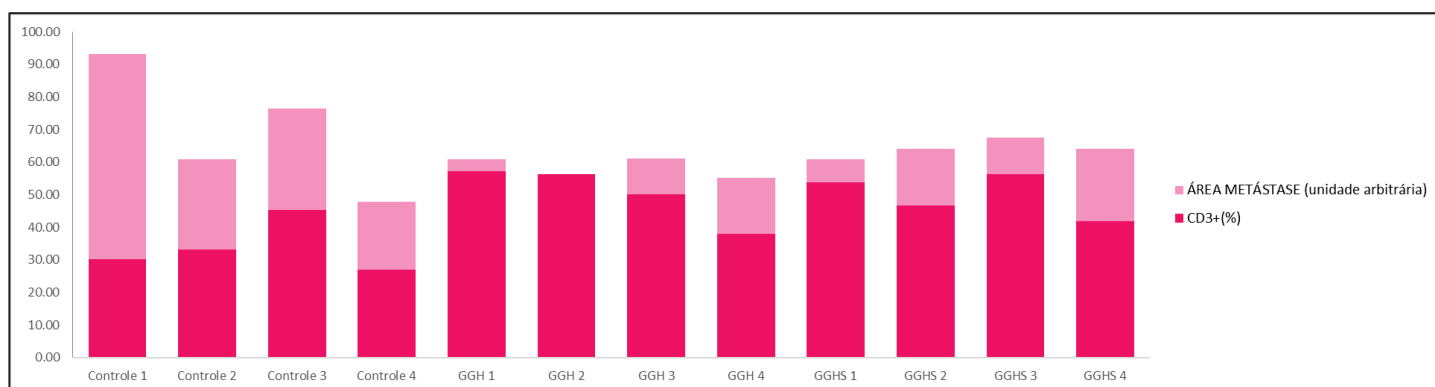
Outro estudo demonstrou o potencial efeito antimetastático de uma galactomanana extraída de *Punica granatum* (PSP001 – 110 kDa). Nesse trabalho, foi realizado um experimento de metástase pulmonar em camundongos C57BL/6 com células de melanoma murino B16-F10. Após dois dias da inoculação, os camundongos receberam tratamento intraperitoneal diário por nove dias com dose de PSP001 a 200 mg/kg. No final do experimento foi possível observar uma redução significativa do número de nódulos no pulmão dos animais tratados com a galactomanana em relação ao controle. Vale ressaltar que também foi realizado o mesmo experimento com um grupo de tratamento PSP001 junto com o quimioterápico Vincristina muito utilizado no tratamento de câncer de pulmão. De maneira similar houve uma redução significativa no número de nódulos de metástase em relação ao grupo controle, sendo portanto um potencial para tratamento coadjuvante (VARGHESE *et al.*, 2017b).

Assim, apesar de não termos observado efeito de redução tumoral estatisticamente significativo com tratamento GGHS e de área de metástase experimental com GGH e GGHS, esses compostos também apresentam potencial para serem utilizados como tratamento coadjuvantes. Além disso, não apresentaram efeitos colaterais nessa fase de estudo *in vivo*, o que complementa a utilização desses compostos nesse tipo de tratamento.

O efeito antimelanoma *in vivo* dos compostos pode estar relacionado ao aumento de infiltrado de células do sistema imune nos tumores e locais de metástase, bem como seu efeito inibidor de galectinas 1 e 3 extracelulares.

Com relação ao sistema imune, foi demonstrado que tanto GGH quanto GGHS apresentam efeito imunomodulador de macrófagos para perfil M1 (Figura 8), que no contexto tumoral tem um efeito anti-tumoral. Além disso, foi possível observar que no pulmão metastático ambos os compostos apresentam aumento do infiltrado de células CD3+ em relação ao grupo controle (Figura 11B). Como comparativo também os animais que apresentavam maior área de metástase também apresentavam menor porcentagem de células CD3+ (Figura 15). Dessa forma, em conjunto, esses resultados podem explicar o menor volume tumoral e área de metástase, apesar de não estatístico, que esses compostos apresentaram.

Figura 15: Comparação da Área de metástase no pulmão com porcentagem de células CD3+



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa os resultados comparativos entre a área de metástase e porcentagem de células CD3+ no pulmão em um mesmo camundongo. Em rosa está representada a área de metástase [somatório dos dois planos dos pulmões (ventral e dorsal)]. Em vermelho está representada a porcentagem de células CD3+ do pulmão dos camundongos (Controle PBS n=5; GGH 5mg/kg n=5; GGHS 5mg/kg n=5).

Além disso, como observado por Braz Junior, 2020 os compostos GGH e GGHS têm a capacidade de se ligarem as galectinas 1 e 3, sendo então potenciais

inibidores dessas proteínas. Muitos estudos demonstraram que os inibidores de galectinas apresentam efeito antimelanoma e que esse efeito também pode estar relacionado com o aumento do recrutamento de linfócitos no tumor (DEMOTTE *et al.*, 2010, 2014a; GORDON-ALONSO; DEMOTTE; VAN DER BRUGGEN, 2014; RADOSAVLJEVIC *et al.*, 2011). Essa relação pode ser uma via pelo qual os compostos de estudos atuam e assim demonstram seu efeito antimelanoma.

Visto que o composto GGHS ainda apresenta atividade biológica antitrombótica, a comparação do seu efeito antimelanoma com outro composto de atividade biológica similar é de extrema importância para compreender seu efeito antimelanoma *in vivo*. Diante disso, o próximo passo foi avaliar o efeito de GGHS sob tumor sólido e metástase experimental comparativamente com Heparina de baixo peso molecular.

Tabela 2: Exame de sangue - Análise de parâmetros bioquímicos.

Grupo experimental	Sangue Bioquímico			
	mg/dL		U/L	
	ALT/TGP	AST/TGO	Creatinina	Ureia
Controle (PBS)	51,00 ± 3,94	556,00 ± 508	0,26 ± 0,08	62,70 ± 30,40
GGH 5 mg/kg	45,30 ± 5,43	342,00 ± 85,9	0,22 ± 0,07	35,70 ± 0,76
GGHS 5 mg/kg	55,30 ± 5,15	665,00 ± 444	0,25 ± 0,05	48,10 ± 10,70

ATL – Enzima Alanina aminotransferase

TGP – Enzima Transaminase glutâmico-pirúvica

AST - Enzima Aspartato aminotransferase

TGO – Enzima Transaminase oxalacética

Dados apresentados como média ± desvio padrão. Foi empregado o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn (p<0,05).

Tabela 3: Exame de sangue - Análise da série eritrocitária.

Grupo experimental	Hemograma Série Eritrocitária						
	pg		%		fL	g/dL	10 ⁶ / uL
	MCH	MCHC	HCT	RDW	MCV	HBG	RBC
Controle (PBS)	13,60 ± 0,19	33,00 ± 0,23	30,70 ± 4,75	12,90 ± 1,33	41,30 ± 0,78	9,61 ± 2,08	7,44 ± 1,23
GGH 5 mg/kg	13,50 ± 0,27	32,70 ± 0,85	29,40 ± 4,43	13,30 ± 1,20	41,50 ± 1,10	9,61 ± 1,51	7,11 ± 1,19
GGHS 5 mg/kg	13,60 ± 0,30	32,70 ± 0,25	27,70 ± 4,69	13,50 ± 1,50	41,50 ± 0,90	9,03 ± 1,58	6,64 ± 1,34

MHC – Hemoglobina corpuscular média

MCHC – Concentração de hemoglobina corpuscular média

HCT – Hematócrito

RDW – Amplitude e distribuição dos glóbulos vermelhos

MCV – Volume corpuscular médio

HBG – Hemoglobina

RBC – Contagem total de glóbulos vermelhos

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Foi empregado o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0,05$).

Tabela 4: Exame de sangue – Análise da série leucocitária.

Grupo experimental	Hemograma Série Leucocitária						
	%				$10^3 / \mu\text{L}$		
	LINF	MON	GRAN	WBC	LINF	MON	GRAN
Controle (PBS)	69,60 $\pm$ 10,10	2,65 $\pm$ 0,84	27,80 $\pm$ 9,46	1,88 $\pm$ 0,90	1,29 $\pm$ 0,57	0,05 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,37
GGH 5 mg/kg	68,40 $\pm$ 10,10	2,70 $\pm$ 0,54	28,90 $\pm$ 6,73	1,65 $\pm$ 0,68	1,15 $\pm$ 0,56	0,02 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,19
GGHS 5 mg/kg	68,90 $\pm$ 7,66	3,23 $\pm$ 1,05	27,90 $\pm$ 6,68	2,35 $\pm$ 1,61	1,64 $\pm$ 1,20	0,06 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,41

LINF – Células linfocíticas

MON – Células mononucleares

GRAN – Células granulocíticas

WBC – Glóbulos Brancos

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Foi empregado o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0,05$).

Tabela 5: Exame de sangue – Análise da série plaquetária.

Grupo experimental	Hemograma Série Plaquetária			
	$10^3 / \mu\text{L}$	fL	-	%
	PLT	MPV	PDW	PCT
Controle (PBS)	414,00 $\pm$ 49,00	7,71 $\pm$ 2,28	15,70 $\pm$ 0,17	0,28 $\pm$ 0,03
GGH 5 mg/kg	379,00 $\pm$ 92,60	6,88 $\pm$ 0,66	15,50 $\pm$ 0,21	0,26 $\pm$ 0,06
GGHS 5 mg/kg	382,00 $\pm$ 43,10	6,51 $\pm$ 0,39	15,40 $\pm$ 0,30	0,25 $\pm$ 0,03

PLT – Contagem de plaquetas

MPV – Volume plaquetário médio

PDW – Variação da distribuição plaquetária

PCT - Plaquetócrito

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Foi empregado o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0,05$).

4.7 VOLUME TUMORAL E ÁREA DE MESTÁSTASE PULMONAR GHHS E LMWH.

O melanoma é um dos diversos tipos de câncer que, em estágio metastático apresenta risco de tromboembolismo venoso aos pacientes (SPARSA *et al.*, 2011; SUSSMAN *et al.*, 2021). As heparinas de baixo peso molecular, além de serem utilizadas na clínica como um tratamento paliativo para essa complicação, apresentam atividade antimelanoma comprovada (HEJNA; RADERER; ZIELINSKI, 1999; MOUSA, 2002, 2004; NIERIS *et al.*, 2009). Como GGHS apresentou atividade antitrombótica e anticoagulante similar ou maior que heparina de baixo peso molecular utilizada na clínica, nos faz acreditar que esse composto tem potencial para ser utilizado no tratamento do melanoma e de pacientes com o quadro de tromboembolismo venoso.

Assim, foram realizados experimentos de tumor sólido e metástase experimental comparativamente com LMWH. Na Figura 16 podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao volume tumoral entre os grupos de tratamento e o controle (FIGURA 16A). Observação similar foi constatada da mesma forma na análise histológica (FIGURA 16B).

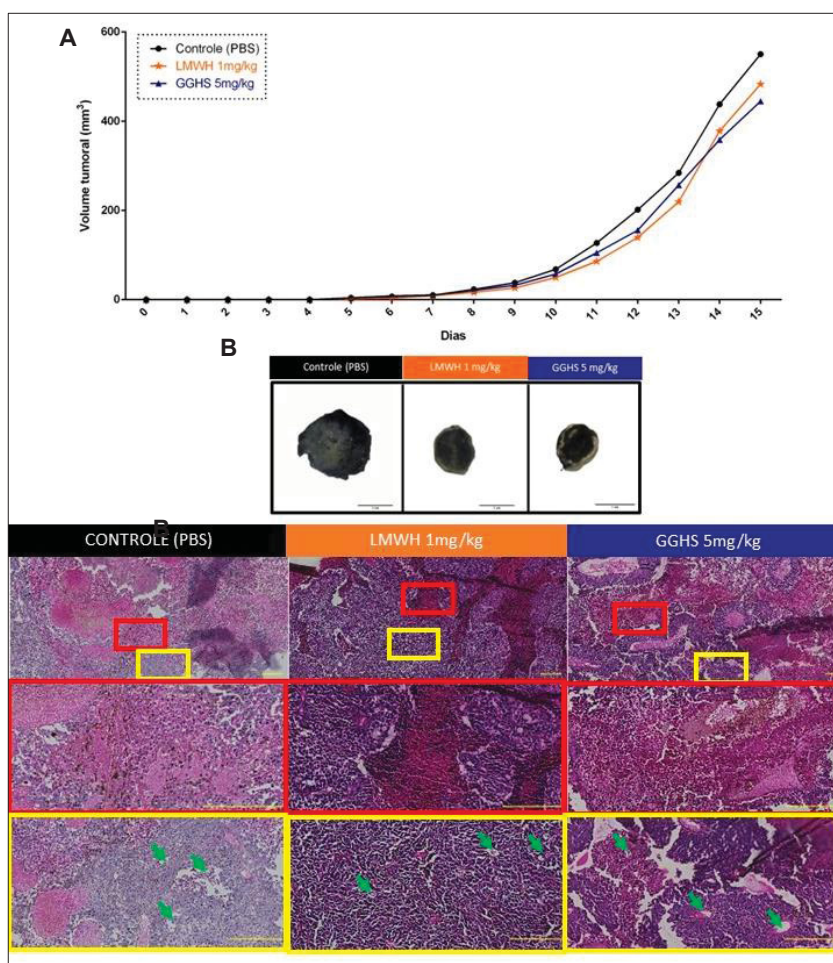
Com relação a metástase pulmonar, podemos observar que os pulmões dos animais tratamentos com ambos os compostos de estudo, não apresentaram diferença estatística, com relação ao controle (FIGURA 17B). Por outro lado, podemos observar na análise dos cortes histológicos uma diferença com relação a área de metástase no pulmão, sendo no grupo controle maior que em relação aos tratamentos (FIGURA 17 C). Além disso, não há diferença estatística em relação ao peso dos órgãos e tumores dos animais e grupos tratados (Tabela 6).

Como já discutido anteriormente, o tratamento de pacientes com risco de tromboembolismo com heparinas deve ser realizado com monitoramento contínuo devido aos riscos de hemorragias e trombocitopenia. Além desse fator da saúde do paciente, deve-se levar em consideração o impacto da produção de heparinas para o uso farmacológico. A fonte de heparinas é a animal, sendo a bovina e suína as principais. Além do grande risco de contaminação por patógenos são necessários muitos animais para a produção de heparinas. Foi estimado cerca de 1,2 bilhões de animais para a produção de heparinas por ano no mundo, sendo necessário um animal para cada três doses de heparina ou para uma dose de heparina de baixo peso molecular (VAN DER MEER; KELLENBACH; VAN DEN BOS, 2017; ZHU; ZHANG;

LINHARDT, 2019), o que justifica a busca por novos compostos antitrombóticos e, com potencial antitumoral.

Devido à dificuldade no tratamento com heparinas (efeitos adversos) e limitações de suas fontes de produção, a investigação de novos agentes anticoagulantes e antitrombóticos é de grande relevância. Apesar de serem encontrados abundantemente de diversas fontes, alguns polissacarídeos de interesse, com similaridade estrutural às heparinas, não possuem grupamentos sulfato naturalmente, sendo esses de grande relevância para atividade anticoagulante e antitrombótica do composto. Assim a sulfatação química de polissacarídeos é um dos processos mais utilizados para obtenção de análogos da heparina (DE ARAÚJO *et al.*, 2013). Dentre eles a galactomanana extraída da goma guar, fonte vegetal, é um grande exemplo para esse tipo de demanda além de ser utilizada da indústria alimentícia e apresentar atividades biológicas (THOMBARE *et al.*, 2016). Diante disso o composto GGHS foi sintetizado para tal objetivo (BARDDAL *et al.*, 2020).

Figura 16: Volume tumoral e histologia GGHS e LMWH.



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos *in vivo* de tumor sólido dos animais tratados ou não (controle) com GGHS e LMWH. (A) O gráfico representa a média do volume tumoral (mm^3) ao longo do tempo de tratamento (Controle PBS n=12; LMWH 1mg/kg n=9; GGHS 5mg/kg n=15;). (B) Imagens representativas da mediana dos tumores de cada grupo. A escala representa 1 cm. (C) Imagens representativas dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina realizadas em escâner de lâminas (Metasystem/Carl Zeiss) sendo que as caixas em vermelho, da segunda linha, representam a ampliação da área de necrose tumoral (presente na primeira linha). Por outro lado, as caixas em amarelo da terceira linha, correspondem à ampliação da área destacada na primeira linha. Essas indicam a mimetização de vasos, conforme indicado pela seta em verde. A escala representa 200 μm . Os dados representam dois experimentos biológicos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA two-way ($p < 0,05$).

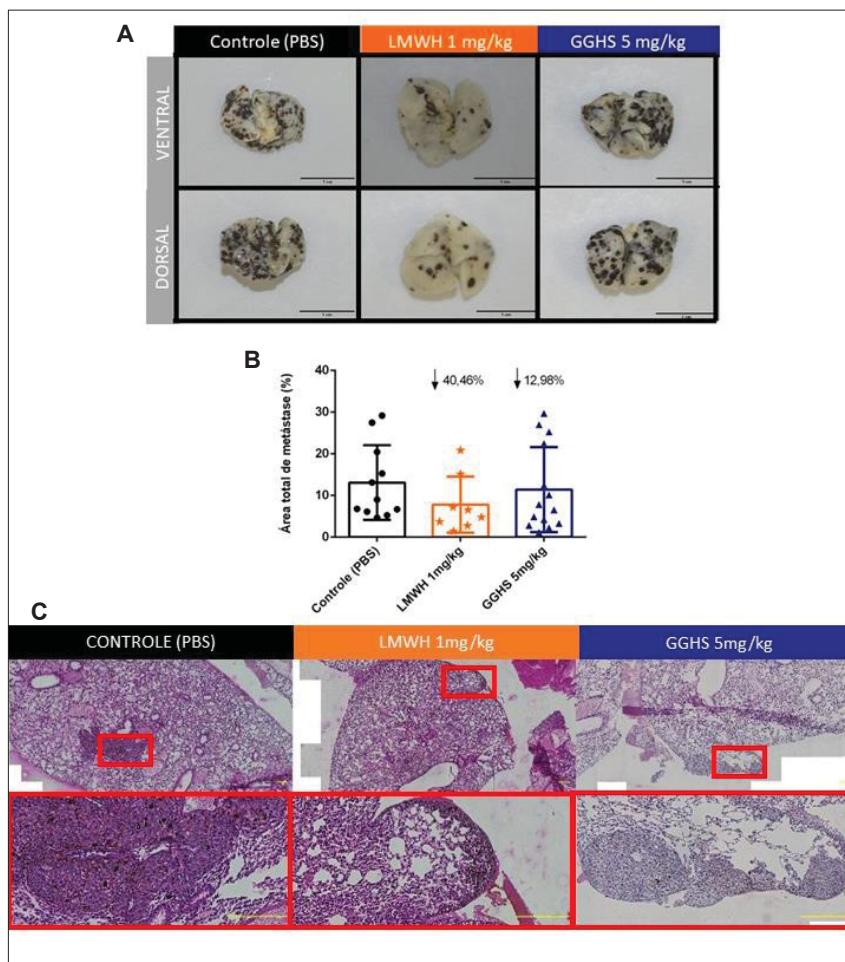
Na literatura já é conhecido que a LMWH possui ação antitumoral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, é importante esclarecer que, os ensaios de tumor sólido e metástase experimental conduzidos em animais foram realizados utilizando a administração desse composto horas antes da inoculação das células, ou concomitante ou, ainda, iniciada no dia seguinte à inoculação (AMIRKHOSRAVI *et al.*, 2003; MOUSA *et al.*, 2006; ONO *et al.*, 2002). Vale ressaltar que o principal intuito de realizar esse procedimento (tratando com LMWH horas antes da inoculação das células, concomitante, ou iniciada no dia seguinte) é pela interação desse composto com selectinas e integrinas, responsáveis pela ancoragem das células tumorais com células endoteliais, plaquetas e leucócitos, como P-selectinas, L-selectina, E-selectina, VLA-4. Essa interação reduz a associação de células cancerosas com essas outras células e isso leva uma redução do número de focos de metástase no pulmão ou diminuição no desenvolvimento tumoral (BENDAS; BORSIG, 2012; LUDWIG *et al.*, 2004, 2006).

Nesse trabalho foi utilizada uma abordagem para avaliar o efeito em estágios mais tardios da doença, dos tratamentos com os compostos anticoagulantes em estudo. Até porque, outros trabalhos demonstraram que LMWH tem potencial efeito atitumoral que vai além da sua associação com selectinas e atividade anticoagulante (MOUSA *et al.*, 2006; VAN SLUIS *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por Borgenström e colaboradores, 2007 demonstrou o efeito antimetástático de um polissacarídeo extraído da parede celular de *Escherichia coli* (composto denominado K5PS) e quimicamente sulfatado em modelo de melanoma murino. Nesse estudo, após a inoculação de células murinas nos animais, esses receberam uma dose diária de 10 mg/kg de K5PS por 21 dias. Após esse período foi analisado o número de nódulos de metástase e o número do grupo tratado com o polissacarídeo foi significativamente menor em relação ao grupo controle. Outro

resultado interessante desse mesmo estudo é que reduzindo o peso molecular da molécula, de 15kDa para 2kDa, esse efeito antimetastático é reduzido, apesar de continuar sendo menor que o controle. Vale ressaltar que essa molécula apresenta atividade anticoagulante reduzida em relação a heparina de baixo peso molecular.

Figura 17: Área de metástase pulmonar e análise histológica de animais tratados com GGHS ou com LMWH.



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos *in vivo* sobre o modelo de metástase pulmonar. (A) Imagens representativas da média dos pulmões de cada grupo. A escala representa 1 cm. (B) O gráfico representa a porcentagem de metástase do somatório dos dois planos dos pulmões (ventral e dorsal) (Controle PBS n=11; LMWH n=8; GGHS 5mg/kg n=14). (C) Imagens representativas dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina realizadas em escâner de lâminas (Metasystem/Carl Zeiss) sendo as caixas em vermelho da segunda linha representam a ampliação da área de nódulo tumoral presente na primeira linha. A escala representa 200 μ m. O gráfico demonstra a média com desvio padrão de dois experimentos biológicos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one-way ($p < 0,05$).

Com relação a LMWH que no presente trabalho não reduziu nenhum dos parâmetros analisados, não reproduzindo o que foi observado por Costa, 2014 e

Cristal, 2019, pode ter sido influenciado pelo modelo duplo *in vivo* aplicado, indicando que pode ter um efeito diferente quando empregado a formação de tumor primário e metástase experimental concomitantemente. Por outro lado, LMWH reduziu em 40,46% a área de metástase total no pulmão (não estatístico), que é um valor muito similar ao que foi obtido por Cristal, 2019 de 36,35%. O fato interessante é que nos dados de análise histológica, apenas com a coloração padrão de hematoxilina e eosina, foi nítida a diferença do tamanho dos nódulos tumorais, o que deve ser estudados com mais detalhes futuramente, até porque isso poderia resultar numa sobrevida, em relação aos animais do grupo controle, o que no câncer metastático altamente agressivo como é o melanoma, é uma possibilidade importante, que não deve ser descartada.

Tabela 6: Peso dos órgãos *in vivo* LMWH e GGHS.

Grupo experimental	Peso dos órgãos (g)					
	Rins	Fígado	Coração	Baço	Pulmão	Tumor
Controle (PBS)	1,39 ± 0,05	5,34 ± 0,31	0,51 ± 0,06	0,36 ± 0,05	0,85 ± 0,17	1,31 ± 1,34
LMWH 1 mg/kg	1,44 ± 0,04	5,37 ± 0,37	0,50 ± 0,06	0,41 ± 0,04	0,80 ± 0,08	0,82 ± 0,07
GGHS 5 mg/kg	1,43 ± 0,01	5,36 ± 0,63	0,50 ± 0,07	0,40 ± 0,05	0,81 ± 0,12	1,33 ± 1,28

Dados apresentados como média ± desvio padrão. Foi empregado o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0,05$).

No presente trabalho, investigamos o potencial efeito antimelanoma e imunoestimulatório do composto GGHS extraído de fonte vegetal, com atividade antitrombótica comprovada e sendo testado pela primeira vez nessas condições. Apesar de não apresentar resultados com diferença estatística com relação ao tumor sólido e metástase experimental, demonstramos potencial imunoestimulatório. Também não se pode descartar seu efeito antitrombótico frente ao melanoma, o que num período maior de tratamento, poderia levar a uma sobrevida em relação aos animais não tratados. Isso porque, o sistema de coagulação tem potencial efeito no desenvolvimento do melanoma. A trombina induz a angiogênese tumoral, regula a adesão das células tumorais às plaquetas e células endoteliais, e promove o crescimento do tumor e metástase. Dessa forma, os compostos

antitrombóticos têm grande potencial de tratamento preventivo ao melanoma (MARAVEYAS *et al.*, 2010; ORNSTEIN; ZACHARSKI, 2001).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial efeito imunomodulatório e antimelanoma dos compostos extraídos da goma guar GGH e GGHS. Os resultados indicam que tanto GGH quanto GGHS apresentam potencial efeito imunomodulador para perfil M1 de macrófagos, aumentando seus marcadores extracelulares bem como espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, foi observado um aumento significativo de células marcadas CD3+ em pulmões metastáticos em relação ao grupo controle. Esses resultados demonstram que os compostos apresentam grande efeito antitumoral. O que foi visto apenas com o composto GGH, que *in vivo*, reduziu significativamente a progressão do volume tumoral. Apesar de não apresentarem diferenças estatísticas os compostos reduziram a área de metástase pulmonar, mostrando um potencial efeito antimetastático. Além disso, os compostos não apresentaram efeitos adversos aos animais, sendo compostos primeiramente testados *in vivo* nesse trabalho e seguros para aplicação como tratamento.

Como já citado anteriormente o composto GGHS apresenta atividade anticoagulante comprovada e por isso foi realizado um estudo comparativo com LMWH, visto seu potencial efeito antimelanoma como anticoagulante. Apesar de não ser observada diferença significativa com relação a progressão do volume tumoral e área de metástase experimental, não descarta seu efeito antimelanoma com outra abordagem de tratamento preventivo ou num período maior de tratamento, ou mesmo seu efeito na sobrevida dos animais, o que pode ser avaliado em trabalhos futuros.

Dessa forma, com a exposição aos compostos, observamos que:

- GGH e GGHS não alteram parâmetros anatômicos e hematológicos em camundongos.
- GGH reduz significativamente a progressão do tumor sólido, enquanto não há diferença estatística com o composto GGHS, em camundongos;

- GGH e GGHS não reduzem estatisticamente a área de metástase no pulmão em camundongos, apesar de demonstrarem uma diferença em 30,77 e 25,64% na área em relação ao controle;
- GGHS e LMWH não apresentaram diferença significativa em tumor sólido e área de metástase experimental em camundongos.
- GGHS e LMWH não reduzem estatisticamente a área de metástase no pulmão em camundongos, apesar de demonstrarem uma diferença em 12,98 e 40,46% na área em relação ao controle.

Esses resultados podem estar relacionados com as seguintes atividades que esses compostos apresentaram no sistema imune:

- GGH e GGHS aumentam os marcadores de perfil M1 em macrófagos *in vitro*;
- GGH e GGHS aumentam espécies reativas de oxigênio em macrófagos;
- GGH e GGHS aumentam a produção de IL-6 e GGH de TNF em sobrenadante de macrófagos.
- GGH e GGHS não alteram a proliferação de linfócitos T *in vitro*;
- GGH e GGHS aumentam os marcadores CD3+ no pulmão metastático de camundongos;

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que as galactomananas parcialmente hidrolisadas e quimicamente sulfatadas, GGH e GGHS, apresentam um potencial efeito imunoestimulatório em macrófagos murinos, conforme os parâmetros de espécies reativas de oxigênio, citocinas quantificadas e imunofenotipagem descrita neste trabalho. Adicionalmente, o composto GGH apresentou efeito antitumoral, reduzindo o volume tumoral de melanoma murino *in vivo*, enquanto ambos GGH e GGHS apresentaram potencial efeito antimetastático, como evidenciado pelo aumento de marcadores de linfócitos nos pulmões metastáticos. Em conclusão, este trabalho destaca os efeitos benéficos desses compostos, sugerindo seu potencial uso terapêutico em condições relacionadas ao melanoma e ao sistema imunológico.

7 REFERÊNCIAS

- A New Agent GM-CT-01 in Combination With 5-FU, Avastin and Leucovorin in Subjects With Colorectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov.** . [S. l.], [S. d.]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00388700>. Acesso em: 8 jun. 2020.
- ALASADY, Milad J. *et al.* The calcium-binding protein S100B reduces IL6 production in malignant melanoma via inhibition of RSK cellular signaling. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 8 August, p. 1–20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256238>
- ALFADDA, Assim A.; SALLAM, Reem M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2012, p. 14, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/936486>
- AMIRKHOSRAVI, A. *et al.* Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 1, n. 9, p. 1972–1976, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00341.x>
- ANDERSON, Nicole M.; SIMON, M. Celeste. The tumor microenvironment. **Current Biology**, [S. l.], v. 30, n. 16, p. R921–R925, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>. Acesso em: 24 ago. 2022.
- ARAP, Wadih *et al.* Steps toward mapping the human vasculature by phage display. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 121–127, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm0202-121>
- BAE, Jae Sung *et al.* Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 218, n. 1, p. 43–52, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2004.08.002>
- BALKWILL, Frances R.; CAPASSO, Melania; HAGEMANN, Thorsten. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>
- BANERJEE, Sanjeev; PARASRAMKA, Mansi; PARUTHY, Shivani B. Polysaccharides in cancer prevention: From bench to bedside. **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**, [S. l.], p. 2179–2214, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_26/COVER. Acesso em: 8 nov. 2022.
- BANH, Alice *et al.* Tumor galectin-1 mediates tumor growth and metastasis through regulation of T-cell apoptosis. **Cancer Research**, [S. l.], v. 71, n. 13, p. 4423–4431, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4157>
- BARDDAL, Helyn Priscila de Oliveira *et al.* Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 145, p. 604–610, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.210>
- BEATTY, Gregory L.; GLADNEY, Whitney L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 687–692, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1860/270283/AM/IMMUNE-ESCAPE-MECHANISMS-AS-A-GUIDE-FOR-CANCER>. Acesso em: 30 set. 2022.
- BENDAS, Gerd; BORSIG, Lubor. Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. **International Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 2012, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/676731>
- BINDEA, Gabriela *et al.* Natural immunity to cancer in humans. **Current Opinion in Immunology**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 215–222, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.006>
- BOBEK, Vladimir; KOVARÍK, Josef. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 213–219, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2003.11.007>
- BONAVENTURA, Paola *et al.* Cold tumors: A therapeutic challenge for immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, n. FEB, p. 168, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00168/BIBTEX>
- BORGENSTRÖM, Marjut *et al.* O-sulfated bacterial polysaccharides with low anticoagulant activity inhibit metastasis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 547–556, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/S-2007-982087/ID/32>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- BORSIG, Lubor. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. **Thrombosis Research**, [S. l.], v. 125, p. S66–S71, 2010. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(10\)70017-7](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(10)70017-7). Acesso em: 8 jun. 2020.
- BOUTILIER, Ava J.; ELSAWA, Sherine F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 22, n. 13, 2021. Disponível

em: <https://doi.org/10.3390/IJMS22136995>. Acesso em: 3 out. 2022.

BRAEUER, Russell R. *et al.* Why is melanoma so metastatic? **Pigment Cell & Melanoma Research**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 19–36, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12172>. Acesso em: 7 jun. 2020.

BRAZ JUNIOR, Odair. **Avaliação da atividade antitumoral da goma guar parcialmente hidrolisada e seu derivado quimicamente sulfatado sobre células de melanoma murino**. 2020. [S. l.], 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria Nº 357, de 8 de abril de 2020**. Brasília, 2020.

BRENNER, Michaela; HEARING, Vincent J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin†. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 539–549, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.2007.00226.X>. Acesso em: 3 out. 2022.

BRÖCKER, E. B. *et al.* Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 562–567, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IJC.2910410415>. Acesso em: 6 nov. 2022.

BRONTE, Vincenzo; MURRAY, Peter J. Understanding Local Macrophage Phenotypes In Disease: Modulating macrophage function to treat cancer. **Nature Medicine** 2015 21:2, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 117–119, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.3794>. Acesso em: 3 out. 2022.

BROUCKAERT, Peter G. G. *et al.* In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN- γ , on a syngeneic murine melanoma. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 763–769, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IJC.2910380521>. Acesso em: 6 nov. 2022.

BROWN, Christine E. *et al.* Tumor-Derived Chemokine MCP-1/CCL2 Is Sufficient for Mediating Tumor Tropism of Adoptively Transferred T Cells. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 179, n. 5, p. 3332–3341, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.5.3332>. Acesso em: 6 nov. 2022.

BRÜGGEMANN, Lois W. *et al.* Experimental melanoma metastasis in lungs of mice with congenital coagulation disorders. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 6B, p. 2622–2627, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00316.x>

BRUNDA, Michael J. *et al.* Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 178, n. 4, p. 1223–1230, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/JEM.178.4.1223>. Acesso em: 6 nov. 2022.

BUCHBINDER, Elizabeth I.; DESAI, Anupam. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 98–106, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000239>

CAISOVA, Veronika *et al.* The significant reduction or complete eradication of subcutaneous and metastatic lesions in a pheochromocytoma mouse model after immunotherapy using mannan-BAM, TLR ligands, and anti-CD40. **Cancers**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers11050654>. Acesso em: 8 set. 2020.

CARDIFF, Robert D.; MILLER, Claramae H.; MUNN, Robert J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, [S. l.], v. 2014, n. 6, p. 655–658, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot073411>

CHEN, Wei Lin *et al.* Locust bean gum galactomannan hydrolyzed by thermostable β -d-mannanase may reduce the secretion of pro-inflammatory factors and the release of granule constituents. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 114, p. 181–186, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.03.097>

CHHABRA, Gagan *et al.* Melanoma Chemoprevention: Current Status and Future Prospects. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 93, n. 4, p. 975–989, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/php.12749>. Acesso em: 8 jun. 2020.

CICHOREK, Mirosława *et al.* Skin melanocytes: Biology and development. **Postępy Dermatologii i Alergologii**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>

CLARK, Wallace H. *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 81, n. 24, p. 1893–1904, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/JNCI/81.24.1893>. Acesso em: 8 nov. 2022.

COSTA, Cleber Rafael Vieira. **Avaliação do mecanismo de ação antitumoral de polissacarídeos sulfatados em camundongos portadores de melanoma**. 2014. - Universidade Federal do Paraná., [S. l.], 2014.

CRISTAL, Aline Miranda. **Avaliação da atividade antitumoral da heparina de baixo peso molecular em modelo de melanoma murino**. 2019. - Universidade Federal do Paraná, [S. l.], 2019.

DA SILVA BARBOSA, Jefferson *et al.* In Vitro Immunostimulating Activity of Sulfated Polysaccharides from *Caulerpa cupressoides* Var. *Flabellata*. **Marine Drugs** 2019, Vol. 17, Page 105, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 105, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MD17020105>. Acesso em: 9 nov. 2022.

DAVIS, Elizabeth J. *et al.* Melanoma: What do all the mutations mean? **Cancer**, [S. I.], v. 124, n. 17, p. 3490–3499, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.31345>. Acesso em: 8 jun. 2020.

DE ARAÚJO, Cristiano A. *et al.* Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate polymers**, [S. I.], v. 91, n. 2, p. 483–491, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBOL.2012.08.034>. Acesso em: 1 dez. 2022.

DE OLIVEIRA, Simone Martins *et al.* *Mercurius solubilis*: actions on macrophages. **Homeopathy**, [S. I.], v. 100, n. 4, p. 228–236, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.HOMP.2011.05.005>

DE VISSER, Karin E.; EICHTEN, Alexandra; COUSSENS, Lisa M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, [S. I.], v. 6, n. 1, p. 24–37, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc1782>

DEMOTTE, Nathalie *et al.* A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. **Cancer Research**, [S. I.], v. 70, n. 19, p. 7476–7488, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0761>

DEMOTTE, Nathalie *et al.* A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes. **Clinical Cancer Research**, [S. I.], v. 20, n. 7, p. 1823–1833, 2014 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2459>

DEMOTTE, Nathalie *et al.* A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes. **Clinical Cancer Research**, [S. I.], v. 20, n. 7, p. 1823–1833, 2014 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2459/86269/AM/A-SHORT-TREATMENT-WITH-GALACTOMANNAN-GM-CT-01>. Acesso em: 10 nov. 2022.

DEN BREEMS, Nicoline Y.; EFTIMIE, Raluca. The re-polarisation of M2 and M1 macrophages and its role on cancer outcomes. **Journal of Theoretical Biology**, [S. I.], v. 390, p. 23–39, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2015.10.034>

DOMINGUES, Beatriz *et al.* Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, [S. I.], v. Volume 7, p. 35–49, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/itt.s134842>

DUDLEY, Mark E. *et al.* Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)**, [S. I.], v. 24, n. 4, p. 363–373, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00002371-200107000-00012>. Acesso em: 8 nov. 2022.

DUNN, Gavin P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology** 2002 3:11, [S. I.], v. 3, n. 11, p. 991–998, 2002 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>. Acesso em: 20 set. 2022.

DUNN, Gavin P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, [S. I.], v. 3, n. 11, p. 991–998, 2002 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>

DUNN, Gavin P.; KOEBEL, Catherine M.; SCHREIBER, Robert D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature Reviews Immunology** 2006 6:11, [S. I.], v. 6, n. 11, p. 836–848, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri1961>. Acesso em: 25 ago. 2022.

DUNN, Gavin P.; OLD, Lloyd J.; SCHREIBER, Robert D. THE THREE ES OF CANCER IMMUNOEDITING. **Annu. Rev. Immunol**, [S. I.], v. 22, p. 329–360, 2004 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>

DUNN, Gavin P.; OLD, Lloyd J.; SCHREIBER, Robert D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Review of Immunology**, [S. I.], v. 22, p. 329–360, 2004 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.22.012703.104803>

DUNN, Gavin P.; OLD, Lloyd J.; SCHREIBER, Robert D. The Three Es of Cancer Immunoediting. **Annual Review of Immunology**, [S. I.], v. 22, n. 1, p. 329–360, 2004 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>

DUQUE, Guillermo Arango; DESCOTEAUX, Albert. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, [S. I.], v. 5, n. OCT, p. 491, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00491/BIBTEX>

EIGENTLER, Thomas K. *et al.* Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. **The Lancet Oncology**, [S. I.], v. 4, n. 12, p. 748–759, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)01280-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(03)01280-4). Acesso em: 8 jun. 2020.

ELIAS, Elias G.; HASSKAMP, Joanne H.; SHARMA, Bhuvnesh K. Cytokines and Growth Factors Expressed by Human Cutaneous Melanoma. **Cancers** 2010, Vol. 2, Pages 794–808, [S. I.], v.

2, n. 2, p. 794–808, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CANCERS2020794>. Acesso em: 6 nov. 2022.

FALANGA, Anna; MARCHETTI, Marina. Heparin in Tumor Progression and Metastatic Dissemination. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 688–694, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2007-991536>. Acesso em: 8 jun. 2020.

FALANGA, Anna; PANOVA-NOEVA, Marina; RUSSO, Laura. Procoagulant mechanisms in tumour cells. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 49–60, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.beha.2008.12.009>

FARHOOD, Bagher; NAJAFI, Masoud; MORTEZAEI, Keywan. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 234, n. 6, p. 8509–8521, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JCP.27782>. Acesso em: 31 out. 2022.

FERRONE, Cristina; DRANOFF, Glenn. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 28, n. 26, p. 4045–4051, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.27.9992>

FLUHR, Herbert; SEITZ, Tina; ZYGMUNT, Marek. Heparins modulate the IFN- γ -induced production of chemokines in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 137, n. 1, p. 109–118, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2334-8>

FRANCO, Rendrik F. FISILOGIA DA COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE. **Medicina**, [S. l.], v. 34, n. 3–4, p. 229–237, 2001.

FU, Qiaofen *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. **Oncolimmunology**, [S. l.], v. 8, n. 7, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593806/SUPPL_FILE/KONI_A_1593806_SM0857.ZIP. Acesso em: 2 out. 2022.

FUKUDA, Toshio *et al.* Impact of antithrombin deficiency on efficacy of edoxaban and antithrombin-dependent anticoagulants, fondaparinux, enoxaparin, and heparin. **Thrombosis Research**, [S. l.], v. 131, n. 6, p. 540–546, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.04.016>

GAMAL-ELDEEN, Amira M.; AMER, Hassan; HELMY, Wafaa A. Cancer chemopreventive and anti-inflammatory activities of chemically modified guar gum. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 161, n. 3, p. 229–240, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.03.010>

GARBE, Claus *et al.* Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2016. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 63, p. 201–217, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.05.005>. Acesso em: 26 jun. 2020.

GAZZANIGA, Silvina *et al.* Targeting Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of MCP-1 Reduce Angiogenesis and Tumor Growth in a Human Melanoma Xenograft. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 127, n. 8, p. 2031–2041, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700827>. Acesso em: 6 nov. 2022.

GERSHENWALD, Jeffrey E. *et al.* Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: a cancer journal for clinicians**, [S. l.], v. 67, n. 6, p. 472–492, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/CAAC.21409>. Acesso em: 31 out. 2022.

GOLDHABER, Samuel Z. Venous thromboembolism: Epidemiology and magnitude of the problem. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 235–242, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BEHA.2012.06.007>

GORDON-ALONSO, Monica; DEMOTTE, Nathalie; VAN DER BRUGGEN, Pierre. Sugars boost exhausted tumorinfiltrating lymphocytes by counteracting immunosuppressive activities of galectins. **Oncolimmunology**, [S. l.], v. 3, n. 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/onci.28783>

GORDON, Randy. Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. **Seminars in Oncology Nursing**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 160–169, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2013.06.002>

GRAY, Elaine; MULLOY, Barbara; BARROWCLIFFE, Trevor W. Heparin and low-molecular-weight heparin. **Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 99, n. 5, p. 807–818, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1160/TH08-01-0032>

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, [S. l.], v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>

GUI, Philippe; BIVONA, Trevor G. Evolution of metastasis: new tools and insights. **Trends in Cancer**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 98–109, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TRECANC.2021.11.002>

GUPTA, Sumit *et al.* Comparative analysis of dietary fiber activities of enzymatic and gamma depolymerized guar gum. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 48, p. 149–154, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.013>

HA, Young min *et al.* Immune enhancing effect of a Maillard-type lysozyme-galactomannan conjugate via signaling pathways. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 60, p. 399–404, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2013.06.007>

HAANEN, John B. A. G. Converting Cold into Hot Tumors by Combining Immunotherapies. **Cell**, [S. l.], v. 170, n. 6, p. 1055–1056, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.08.031>

HAN, Sang Bae *et al.* The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. **Immunopharmacology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 157–164, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(98\)00063-0](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(98)00063-0)

HAN, Sang Bae *et al.* Pectic polysaccharide isolated from *Angelica gigas* Nakai inhibits melanoma cell metastasis and growth by directly preventing cell adhesion and activating host immune functions. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 243, n. 2, p. 264–273, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2005.11.040>

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>. Acesso em: 24 ago. 2022.

HANAHAN, Douglas; COUSSENS, Lisa M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [S. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>. Acesso em: 6 jun. 2020.

HARTMAN, Rebecca I.; LIN, Jennifer Y. Cutaneous Melanoma—A Review in Detection, Staging, and Management. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 25–38, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.09.005>. Acesso em: 27 jun. 2020.

HEJNA, M.; RADERER, M.; ZIELINSKI, C. C. Inhibition of metastases by anticoagulants. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 91, n. 1, p. 22–36, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/91.1.22>

HELSON, Lawrence *et al.* Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. **Nature** 1975 258:5537, [S. l.], v. 258, n. 5537, p. 731–732, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/258731a0>. Acesso em: 6 nov. 2022.

HIAM-GALVEZ, Kamir J.; ALLEN, Breanna M.; SPITZER, Matthew H. Systemic immunity in cancer. **Nature Reviews Cancer** 2021 21:6, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 345–359, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00347-z>. Acesso em: 2 out. 2022.

HIRSH, Jack *et al.* Heparin and Low-Molecular- Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. **Chest**, [S. l.], v. 119, p. 64–94, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1378/chest.119.1_suppl.64S

HODI, F. Stephen *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 363, n. 8, p. 711–723, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>. Acesso em: 8 jun. 2020.

HOEJBERG, Lise; BASTHOLT, Lars; SCHMIDT, Henrik. Interleukin-6 and melanoma. **Melanoma Research**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 327–333, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283543d72>

HUSSEIN, Mahmoud R.; HUSSEIN MSCPATH, Mahmoud R. Tumour-associated macrophages and melanoma tumourigenesis: integrating the complexity. **International Journal of Experimental Pathology**, [S. l.], v. 87, n. 3, p. 163–176, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2613.2006.00478.X>. Acesso em: 8 nov. 2022.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

ITAKURA, Eijun *et al.* IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. **Modern Pathology** 2011 24:6, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 801–809, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.5>. Acesso em: 6 nov. 2022.

JIN, Sora *et al.* Anti-Melanoma Activities and Phytochemical Compositions of *Sorbus commixta* Fruit Extracts. **Plants** 2020, Vol. 9, Page 1076, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1076, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PLANTS9091076>. Acesso em: 8 nov. 2022.

KEIR, Mary E. *et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 26, p. 677–704, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>

KIM, Gi Young *et al.* Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 95, n. 1, p. 69–76, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2004.06.024>

KIM, Ryungsa. Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. **Cancer Immunotherapy**, [S. l.], p. 9–27, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012372551-6/50066-3>

KIM, Ryungsa; EMI, Manabu; TANABE, Kazuaki. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, [S. l.], v. 121, n. 1, p. 1–14, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>

KIRKIN, Alexei F. *et al.* Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. **APMIS**, [S. l.], v. 106, n. 7–12, p. 665–679, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1699-0463.1998.TB00210.X>. Acesso em: 8 nov. 2022.

KLERK, Clara P. W. *et al.* The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 2130–2135, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.134>

KLYOSOV, Anatole; ZOMER, Eliezer; PLATT, David. DAVANAT® (GM-CT-01) and colon cancer: Preclinical and clinical (Phase I and II) studies. In: 2012, **ACS Symposium Series**. : American Chemical Society, 2012. p. 89–130. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bk-2012-1102.ch004>. Acesso em: 16 jul. 2020.

KOGA, Mitsuhsa *et al.* Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 365, n. 2, p. 279–284, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.182>

KOZAR, Ines *et al.* Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1871, n. 2, p. 313–322, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.02.002>

KOZAR, Ines *et al.* **Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.02.002>

KRISHNAN, Vaidehi *et al.* Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium. **Clinical and Experimental Metastasis**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 11–24, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10585-005-2036-2>

KUBO, Hiroshi *et al.* Primary tumors limit metastasis formation through induction of IL15-mediated cross-talk between patrolling monocytes and NK cells. **Cancer Immunology Research**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 812–820, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0082>. Acesso em: 8 set. 2020.

KUDO-SAITO, Chie *et al.* Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 195–206, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.023>. Acesso em: 8 set. 2020.

KUDO-SAITO, Chie *et al.* Blocking the FSTL1-DIP2A Axis Improves Anti-tumor Immunity. **Cell Reports**, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 1790–1801, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.043>

KUDO-SAITO, Chie; FUWA, Takafumi; KAWAKAMI, Yutaka. Targeting ALCAM in the cryo-treated tumour microenvironment successfully induces systemic anti-tumour immunity. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 62, p. 54–61, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.04.013>

KUMARI, Manisha *et al.* Pro-inflammatory macrophage polarization enhances the anti-cancer efficacy of self-assembled galactomannan nanoparticles entrapped with hydrazinocurcumin. **Drug Delivery and Translational Research**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1159–1188, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S13346-019-00661-Y/FIGURES/10>. Acesso em: 9 nov. 2022.

LAMBERT, Arthur W.; PATTABIRAMAN, Diwakar R.; WEINBERG, Robert A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, [S. l.], v. 168, n. 4, p. 670–691, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>. Acesso em: 8 jun. 2020.

LAURIENZO, Paola. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. **Marine Drugs 2010, Vol. 8, Pages 2435-2465**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 2435–2465, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MD8092435>. Acesso em: 8 nov. 2022.

LÁZAR-MOLNÁR, Eszter *et al.* AUTOCRINE AND PARACRINE REGULATION BY CYTOKINES AND GROWTH FACTORS IN MELANOMA. **Cytokine**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 547–554, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/CYTO.1999.0614>

LEUNG, Anna M.; HARI, Danielle M.; MORTON, Donald L. Surgery for Distant Melanoma Metastasis. **The Cancer Journal**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 176–184, 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31824bc981>. Acesso em: 8 jun. 2020.

LEUNG, M. Y. K. *et al.* Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from Aloe vera L. var. chinensis (Haw.) Berg. **Glycobiology**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 501–510, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWH050>. Acesso em: 16 out. 2022.

LI, Ye *et al.* Natural Polysaccharides and Their Derivates: A Promising Natural Adjuvant for Tumor Immunotherapy. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.621813/FULL>. Acesso em: 8 nov. 2022.

LIMA, Marcelo; RUDD, Timothy; YATES, Edwin. New Applications of Heparin and Other Glycosaminoglycans. **Molecules**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 749, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22050749>. Acesso em: 8 jun. 2020.

LIU, Yuan Tong; SUN, Zhi Jun. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. **Theranostics**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 5365, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/THNO.58390>. Acesso em: 8 nov. 2022.

LÓPEZ-JANEIRO, Álvaro *et al.* Prognostic value of macrophage polarization markers in epithelial neoplasms and melanoma. A systematic review and meta-analysis. **Modern Pathology** 2020 **33:8**, [S. l.], v. 33, n. 8, p. 1458–1465, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0534-z>. Acesso em: 8 nov. 2022.

LUDWIG, Ralf J. *et al.* Endothelial P-Selectin as a Target of Heparin Action in Experimental Melanoma Lung Metastasis. **Cancer Research**, [S. l.], v. 64, n. 8, p. 2743–2750, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1054>

LUDWIG, Ralf J. *et al.* The ability of different forms of heparin to suppress P-selectin function in vitro correlates to their inhibitory capacity on blood-borne metastasis in vivo. **Thromb. Haemostasis**, [S. l.], v. 95, p. 535–540, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1160/TH05-07-0515>

MANTOVANI, Alberto; SICA, Antonio. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Current Opinion in Immunology**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 231–237, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.COI.2010.01.009>

MARAVEYAS, Anthony *et al.* Malignant melanoma as a target malignancy for the study of the anti-metastatic properties of the heparins. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 777–784, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9263-y>

MARTÍNEZ-LOSTAO, Luis; ANEL, Alberto; PARDO, Julián. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 21, n. 22, p. 5047–5056, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0685>. Acesso em: 31 out. 2022.

MAZEPA, Ester *et al.* Structural characteristics of native and chemically sulfated polysaccharides from seaweed and their antimelanoma effects. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 289, p. 119436, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2022.119436>

MELO, Camila Morais. **Envolvimento das galectinas na angiogênese tumoral em modelo de melanoma murino e associação com o microambiente tumoral via receptores toll-like**. **Envolvimento das galectinas na angiogênese tumoral em modelo de melanoma murino e associação com o microambiente**. 2015. [s. l.], 2015.

MENG, Xin; LIANG, Hebin; LUO, Lixin. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. **Carbohydrate Research**, [S. l.], v. 424, p. 30–41, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2016.02.008>

MIGNOGNA, C. *et al.* Innate immunity in cutaneous melanoma. **Clinical and Experimental Dermatology**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 243–250, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/CED.13023>. Acesso em: 8 nov. 2022.

MISHRA, Harshita *et al.* Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [S. l.], v. 144, n. 12, p. 2283–2302, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2726-1>

MITTAL, Deepak *et al.* New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. **Current Opinion in Immunology**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 16–25, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.COI.2014.01.004>

MOUSA, Shaker A. Anticoagulants in thrombosis and cancer: The missing link. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 45–52, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2002-20559>

MOUSA, Shaker A. Low-molecular-weight heparin in thrombosis and cancer. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [S. l.], v. 30, n. SUPPL. 1, p. 25–30, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2004-823000>

MOUSA, Shaker A. *et al.* Anti-metastatic effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. **Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 96, n. 6, p. 816–821, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1160/TH06-05->

0289/ID/JR0289-5. Acesso em: 29 nov. 2022.

NA, Yi Rang *et al.* Interleukin-6-induced Twist and N-cadherin enhance melanoma cell metastasis. **Melanoma Research**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 434–443, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000021>

NAJAFI, Masoud *et al.* Macrophage polarity in cancer: A review. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 2756–2765, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JCB.27646>. Acesso em: 31 out. 2022.

NAKAMURA, Kyohei; SMYTH, Mark J.; MARTINET, Ludovic. Cancer immunoediting and immune dysregulation in multiple myeloma. **Blood**, [S. l.], v. 136, n. 24, p. 2731–2740, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2020006540>. Acesso em: 20 set. 2022.

NAKASONE, Yuko *et al.* Host-Derived MCP-1 and MIP-1 α Regulate Protective Anti-Tumor Immunity to Localized and Metastatic B16 Melanoma. **The American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 180, n. 1, p. 365–374, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2011.09.005>

NELSON, Brad H. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 222, n. 1, p. 101–116, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00614.x>

NIERS, Tatjana M. H. *et al.* Differential effects of anticoagulants on tumor development of mouse cancer cell lines B16, K1735 and CT26 in lung. **Clinical and Experimental Metastasis**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 171–178, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9227-6>

ONO, K. *et al.* Periodate-treated, non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 86, n. 11, p. 1803–1812, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600307>

ORNSTEIN, Deborah L.; ZACHARSKI, Leo R. Treatment of cancer with anticoagulants: Rationale in the treatment of melanoma. **International Journal of Hematology**, [S. l.], v. 73, n. 2, p. 157–161, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02981932>

OSHI, Masanori *et al.* M1 Macrophage and M1/M2 ratio defined by transcriptomic signatures resemble only part of their conventional clinical characteristics in breast cancer. **Scientific Reports** 2020 10:1, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73624-w>. Acesso em: 31 out. 2022.

PAGÈS, F. *et al.* Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**, [S. l.], v. 29, n. 8, p. 1093–1102, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2009.416>

PALTA, Sanjeev; SAROA, Richa; PALTA, Anshu. Overview of the coagulation system. **Indian Journal of Anaesthesia**, [S. l.], v. 58, n. 5, p. 515, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643>. Acesso em: 3 dez. 2021.

PASSARELLI, Anna *et al.* Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. **Oncotarget**, [S. l.], v. 8, n. 62, p. 106132, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.22190>. Acesso em: 20 jan. 2022.

PAULOVÍČOVÁ, Ema *et al.* Immunobiological activity of synthetically prepared immunodominant galactomannosides structurally mimicking aspergillus galactomannan. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 8, n. OCT, p. 1273, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01273/BIBTEX>

PINEDA-TORRA, Inés *et al.* Isolation, culture, and polarization of murine bone marrow-derived and peritoneal macrophages. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 1339, p. 101–109, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2929-0_6

QUAH, Benjamin J. C.; PARISH, Christopher R. The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation Protocol 1) Reagent Setup. **J. Vis. Exp**, [S. l.], v. 44, n. 44, p. 2259, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/2259>. Acesso em: 1 dez. 2021.

RADOSAVLJEVIC, Gordana *et al.* Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. **Clinical and Experimental Metastasis**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 451–462, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9383-y>

RAHIR, Gwendoline; MOSER, Muriel. Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 61, n. 6, p. 751–759, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1253-1>

RICHMOND, Ann; YANG, Jinming; SU, Yingjun. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 175–186, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1755-148X.2009.00554.X>. Acesso em: 6 nov. 2022.

ROZEMAN, Elisa A. *et al.* Advanced Melanoma: Current Treatment Options, Biomarkers, and

Future Perspectives. **American Journal of Clinical Dermatology**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 303–317, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0325-6>. Acesso em: 8 jun. 2020.

SANTANDER, S. P. *et al.* Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 652–660, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2011.01.006>

SANTI, Flávia Crystina. **Avaliação das alterações moleculares causadas por polissacarídeos sulfatados em modelo de melanoma in vitro**. 2015. - Universidade Federal do Paraná, [s. l.], 2015.

SANTOS, Ed Wilson *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos das linhagens C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 138–145, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145>

SCHADENDORF, Dirk *et al.* Melanoma. **Lancet (London, England)**, [S. l.], v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)

SCHELLER, Jürgen *et al.* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2011.01.034>

SCHEPETKIN, Igor A.; QUINN, Mark T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 317–333, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2005.10.005>

SCHREIBER, Robert D.; OLD, Lloyd J.; SMYTH, Mark J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, [S. l.], v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011 a. Disponível em: https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1203486/SUPPL_FILE/1565.MP3. Acesso em: 5 set. 2022.

SCHREIBER, Robert D.; OLD, Lloyd J.; SMYTH, Mark J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1203486>. Acesso em: 20 set. 2022.

SCHREIBER, Robert D.; OLD, Lloyd J.; SMYTH, Mark J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, [S. l.], v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011 c. Disponível em: https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1203486/SUPPL_FILE/1565.MP3. Acesso em: 20 set. 2022.

SHAIN, A. Hunter *et al.* The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 373, n. 20, p. 1926–1936, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502583>

SHARMA, Padmanee *et al.* Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. **Cell**, [S. l.], v. 168, n. 4, p. 707–723, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>

SHIN, Kwang Soon. The Chemical Characteristics and Immune-Modulating Activity of Polysaccharides Isolated from Cold-Brew Coffee. **Preventive Nutrition and Food Science**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 100, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3746/PNF.2017.22.2.100>. Acesso em: 9 nov. 2022.

SILVA, Ana Paula *et al.* Avaliação dos parâmetros bioquímicos em soro de camundongos tratados com *Garcinielliptona* FC. [S. l.], n. 1c, p. 1980, 2012.

SIMÕES, Joana *et al.* Immunostimulatory properties of coffee mannans. **Molecular Nutrition & Food Research**, [S. l.], v. 53, n. 8, p. 1036–1043, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MNFR.200800385>. Acesso em: 16 out. 2022.

SMYTH, Mark J.; GODFREY, Dale I.; TRAPANI, Joseph A. **A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <http://immunol.nature.com>.

SPARSA, A. *et al.* High prevalence and risk factors of thromboembolism in stage IV melanoma. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 340–344, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03795.x>. Acesso em: 29 nov. 2022.

SPINELLI, M. O. *et al.* Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. [S. l.], v. 8, p. 1–8, 2012.

STEEG, Patricia S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 201–218, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.25>

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>. Acesso em: 20 nov. 2022.

SUSSMAN, Tamara A. *et al.* Incidence of thromboembolism in patients with melanoma on

immune checkpoint inhibitor therapy and its adverse association with survival. **J Immunother Cancer**, [S. l.], v. 9, p. 1719, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001719>. Acesso em: 29 nov. 2022.

TAMURA, Ryota *et al.* Dual role of macrophage in tumor immunity. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0006>, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 899–909, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/IMT-2018-0006>. Acesso em: 31 out. 2022.

TAO, Yuheng *et al.* Effects of seleno-Sesbania canabina galactomannan on anti-oxidative and immune function of macrophage. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 261, p. 117833, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.117833>

TENG, Michele W. L. *et al.* Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 84, n. 4, p. 988–993, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/JLB.1107774>. Acesso em: 20 set. 2022.

TEVYASHOVA, A. N. *et al.* New conjugates of antitumor antibiotic doxorubicin with water-soluble galactomannan: Synthesis and biological activity. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry** **2007** **33:1**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 139–145, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1068162007010153>. Acesso em: 7 nov. 2022.

THOMBARE, Nandkishore *et al.* Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 88, p. 361–372, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001>

THOMPSON, John F.; SCOLYER, Richard A.; KEFFORD, Richard F. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, [S. l.], v. 365, n. 9460, p. 687–701, 2005. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17951-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17951-3)

VAN BELLE, Patricia *et al.* Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms. **The American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 148, n. 6, p. 1887, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1861638/>?report=abstract. Acesso em: 6 nov. 2022.

VAN DER MEER, Jan Ytzen; KELLENBACH, Edwin; VAN DEN BOS, Leendert J. From Farm to Pharma: An Overview of Industrial Heparin Manufacturing Methods. **Molecules** **2017**, Vol. **22**, Page **1025**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 1025, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22061025>. Acesso em: 1 dez. 2022.

VAN DOORMAAL, Frederiek F. *et al.* Randomized trial of the effect of the low molecular weight heparin nadroparin on survival in patients with cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 29, n. 15, p. 2071–2076, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.9293>

VAN SLUIS, Geerte L. *et al.* A Low Molecular Weight Heparin Inhibits Experimental Metastasis in Mice Independently of the Endothelial Glycocalyx. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. e11200, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0011200>. Acesso em: 2 dez. 2022.

VARGHESE, Sheeja *et al.* International Journal of Biological Macromolecules The inhibitory effect of anti- tumor polysaccharide from Punica granatum on metastasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 103, p. 1000–1010, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.137>

VARGHESE, Sheeja *et al.* The inhibitory effect of anti- tumor polysaccharide from Punica granatum on metastasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 103, p. 1000–1010, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.05.137>

VARKI, Ajit. Trousseau's syndrome: Multiple definitions and multiple mechanisms. **Blood**, [S. l.], v. 110, n. 6, p. 1723–1729, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-053736>

VESELY, Matthew D. *et al.* Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annual review of immunology**, [S. l.], v. 29, p. 235–271, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-031210-101324>. Acesso em: 30 set. 2022.

VOGLER, Erwin A.; SIEDLECKI, Christopher A. Contact activation of blood-plasma coagulation. **Biomaterials**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1857–1869, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.12.041>. Acesso em: 3 dez. 2021.

WASSER, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology** **2002** **60:3**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 258–274, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00253-002-1076-7>. Acesso em: 16 out. 2022.

WEAGEL, Evita G. *et al.* Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. **Article in Journal of Clinical & Cellular Immunology**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000338>. Acesso em: 31 out. 2022.

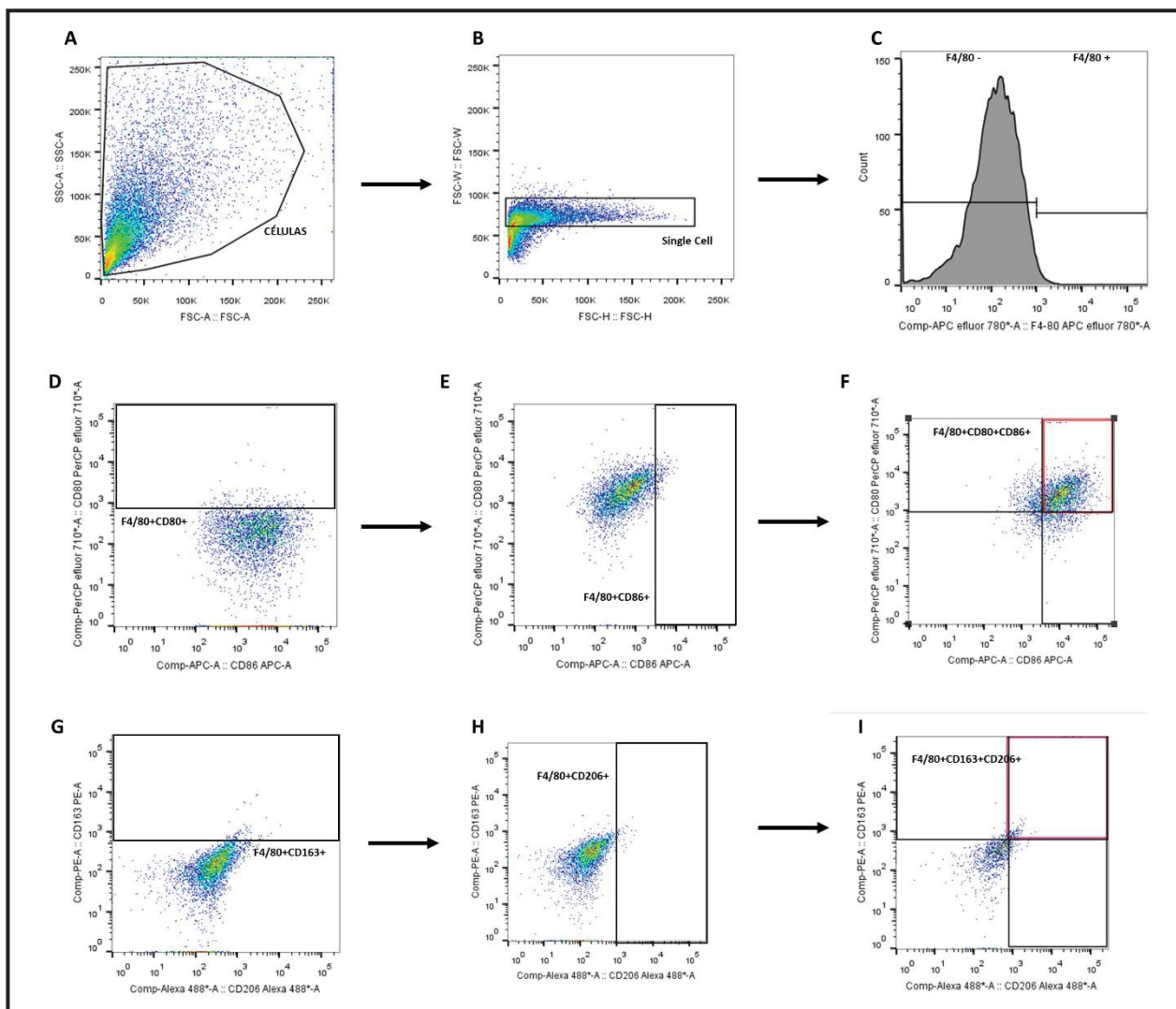
WELCH, Danny R. Tumor Heterogeneity--A 'Contemporary Concept Founded on Historical Insights and Predictions. **Cancer Research**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 4–6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3024>. Acesso em: 6 jun. 2020.

WHITEMAN, David C.; WHITEMAN, Catherine A.; GREEN, Adele C. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: A systematic review of epidemiologic studies. **Cancer Causes and**

- Control**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 69–82, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1008980919928>
- WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, [S. l.], v. 27, n. 45, p. 5904–5912, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>
- WILD, Christopher P.; WEIDERPASS, Elisabete; STEWART, Bernard W. **World Cancer report 2020: Cancer Research for Cancer Prevention**. **Cancer Control**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cma.2010.02.010>.
- XU, Duoduo *et al.* Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharide isolated from *Pleurotus eryngii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 92, p. 30–36, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.07.016>
- YANG, Xiaoping *et al.* Characterization and anti-tumor activity of pollen polysaccharide. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 401–408, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2006.11.001>
- YOON, Seon-Joo; CHU, Djong-Chi; RAJ JUNEJA, Lekh. Chemical and Physical Properties, Safety and Application of Partially Hydrolyzed Guar Gum as Dietary Fiber. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 1–7, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3164/jcbn.2008001>. Acesso em: 8 jun. 2020.
- YU, Yen-Rei A. *et al.* A Protocol for the Comprehensive Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Normal and Inflamed Murine Non-Lymphoid Tissues. [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150606>
- YUAN, Ang *et al.* Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. **Scientific Reports** 2015 5:1, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–12, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep14273>. Acesso em: 31 out. 2022.
- ZACHARSKI, Leo R.; ORNSTEIN, Deborah L. **Heparin and cancer**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615131>
- ZHANG, Meiyong *et al.* A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. **Journal of Ovarian Research**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–16, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-19/FIGURES/4>. Acesso em: 31 out. 2022.
- ZHANG, Nan Nan *et al.* Characterization and immunomodulatory effect of an alkali-extracted galactomannan from *Morchella esculenta*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 278, p. 118960, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118960>
- ZHANG, Ning *et al.* Low molecular weight heparin and cancer survival: clinical trials and experimental mechanisms. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [S. l.], v. 142, n. 8, p. 1807–1816, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2131-6>
- ZHU, Yuanyuan; ZHANG, Fuming; LINHARDT, Robert J. Heparin Contamination and Issues Related to Raw Materials and Controls. **AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series**, [S. l.], v. 32, p. 191–206, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-11751-1_11/COVER. Acesso em: 1 dez. 2022.
- ZONG, Aizhen; CAO, Hongzhi; WANG, Fengshan. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 1395–1410, 2012 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.026>. Acesso em: 8 jun. 2020.
- ZONG, Aizhen; CAO, Hongzhi; WANG, Fengshan. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 1395–1410, 2012 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.07.026>
- ZUBIETA, Mariana Rodríguez *et al.* Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. **American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 168, n. 5, p. 1666–1675, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050971>. Acesso em: 28 jul. 2020.

8 ANEXO

Anexo 1: Workflow análise imunofenotipagem



Fonte: o autor (2023).

LEGENDA: A figura acima representa o passo-a-passo da análise da imunofenotipagem de macrófagos da medula óssea. (A) *Gate* de células a serem analisadas, grupo branco. (B) *Gate* de single cells das células a serem analisadas, grupo branco. (C) *Gate* de células F4/80+, grupo FMO F4/80+. (D) *Gate* de células F4/80+CD80+, grupo FMO CD80+. (E) *Gate* de células F4/80+CD86+, grupo FMO CD86+. (F) *Gate* de células F4/80+CD80+CD86+, grupo Controle M1. (G) *Gate* de células F4/80+CD163+, grupo FMO CD163+. (H) *Gate* de células F4/80+CD206+, grupo FMO CD206+. (I) *Gate* de células F4/80+CD163+CD206+, grupo Controle M2.