

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Patologia

Larissa Ferreira Brito

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE DIFERENTES
 β -D-GLUCANAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA: Uma
abordagem imunológica**

Belo Horizonte - MG
2025

Larissa Ferreira Brito

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE DIFERENTES
β-D-GLUCANAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA: Uma
abordagem imunológica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia - área de concentração em Patologia Oncológica.

Orientadora: Profa. Dra. Sara Santos Bernardes

Coorientador: Prof. Dr. Remo e Castro Russo

Coorientadora: Profa. Dra. Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz

Belo Horizonte - MG

2025

043

Brito, Larissa Ferreira.

Avaliação comparativa da atividade antitumoral de diferentes β -d-glucanas em modelo experimental de melanoma: uma abordagem imunológica [manuscrito] / Larissa Ferreira Brito. – 2025.

142 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Sara Santos Bernardes. Coorientador: Prof. Dr. Remo de Castro Russo. Coorientadora: Profa. Dra. Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Melanoma. 3. Glucanos. 4. Imunoterapia. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. 6. Receptores Toll-Like. 7. Interferon gama. I. Bernardes, Sara Santos. II. Russo, Remo de Castro. III. Queiroz, Nina Marí Gual Pimenta de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE DIFERENTES B-D-GLUCANAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA: UMA ABORDAGEM IMUNOLÓGICA”

LARISSA FERREIRA BRITO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 12 de junho de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Residente Pós-Doutoral Dr. Jorge Lucas Nascimento Souza, ICB/UFMG
Prof. Dr. Bruno Machado Bertassoli, Anclivepa
Prof. Dr. Remo de Castro Russo, ICB/UFMG - COORIENTADOR
Profa. Dra. Sara Santos Bernardes, ICB/UFMG - ORIENTADORA

Belo Horizonte, 12 de junho de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Sara Santos Bernardes, Professora do Magistério Superior**, em 13/06/2025, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo, Professor do Magistério Superior**, em 17/06/2025, às 13:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Machado Bertassoli, Usuário Externo**, em 19/06/2025, às 09:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Lucas Nascimento Souza, Usuário Externo**, em 19/06/2025, às 13:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4292599** e o código CRC **1C3F74DD**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 505 DE LARISSA FERREIRA BRITO

Realizou-se, no dia 12 de junho de 2025, às 14 horas, na Sala de Reuniões do Departamento de Patologia Geral – ICB/UFMG, Bloco C, 3ª andar, no Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, a defesa de Dissertação, intitulada “*Avaliação Comparativa da Atividade Antitumoral de Diferentes β -D-Glucanas em Modelo Experimental de Melanoma: uma abordagem imunológica*”, apresentada por **Larissa Ferreira Brito** número de registro 2023665749, graduada no curso de Medicina Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Residente Pós-Doutoral Dr. Jorge Lucas Nascimento Souza**, ICB/UFMG; **Prof. Dr. Bruno Machado Bertassoli**, Anclivepa; **Prof. Dr. Remo de Castro Russo**, ICB/UFMG – **COORDENADOR**; **Profa. Dra. Sara Santos Bernardes**, ICB/UFMG – **ORIENTADORA**.

A Comissão considerou a Dissertação:

(X) APROVADA

() REPROVADA

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 12 de junho de 2025.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.



Documento assinado eletronicamente por **Sara Santos Bernardes, Professora do Magistério Superior**, em 13/06/2025, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo, Professor do Magistério Superior**, em 17/06/2025, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Machado Bertassoli, Usuário Externo**, em 19/06/2025, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Lucas Nascimento Souza, Usuário Externo**, em 19/06/2025, às 13:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Agradecimentos

Concluir o mestrado com certeza foi uma das experiências mais desafiadoras e transformadoras da minha vida. Um caminho cheio de obstáculos, descobertas e, acima de tudo, resiliência. Em meio aos altos e (muitos) baixos, tive a sorte imensa de encontrar pessoas extraordinárias que tornaram essa trajetória não apenas possível, mas também muito mais leve e significativa.

À minha orientadora, Sara, minha eterna gratidão. Obrigada por acreditar no meu potencial e se esforçar pra deixar o fardo o mais leve possível, sempre. Seu voto de confiança, sua escuta atenta e seu apoio constante foram essenciais para que esse trabalho se tornasse realidade.

Aos meus coorientadores, Nina e Remo, agradeço profundamente pela disponibilidade, por tantas vezes abrirem as portas de seus laboratórios para me acolher e por contribuírem de forma essencial para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos colegas de laboratório, que se tornaram muito mais que isso — Ana Carolina, Guilherme, Bruna, Marisa, Gabi, Esther e Roberta: vocês foram fundamentais. Obrigada por abraçarem esse projeto como se fosse de vocês. Obrigada por cada final de semana e feriado que deixaram os seus compromissos para se dedicarem por mim. Entre experimentos, conversas, lab(ou lari)meetings, risadas, choros e trocas valiosas, vocês cativaram um lugar especial em mim.

Aos professores do Departamento de Patologia Geral do ICB, meu sincero reconhecimento. Suas aulas, questionamentos e entusiasmo contribuíram imensamente para a minha formação, despertando em mim uma curiosidade genuína e a vontade constante de aprender mais.

À minha família, agradeço por todo amor, paciência e apoio incondicional. Aos meus amigos de fora do laboratório, que mesmo distantes do ambiente acadêmico, me ofereceram leveza, escuta e refúgio — vocês foram essenciais para manter minha sanidade e meu ânimo nos momentos mais difíceis.

Sou imensamente grata por ter cruzado com pessoas tão especiais ao longo desse caminho. Esse trabalho é fruto de uma construção coletiva, e carrega um pedacinho de cada um que esteve ao meu lado.

Por fim, não posso deixar de reforçar a importância de fazer ciência no Brasil.

Produzir conhecimento em um cenário tantas vezes desfavorável exige coragem, persistência e paixão. A ciência resiste diariamente — nos laboratórios, nas universidades públicas, nas mãos de alunos, professores e pesquisadores que, mesmo diante de tantos desafios, seguem acreditando no poder transformador da educação e da pesquisa. Fazer parte disso é motivo de orgulho e esperança.

Resumo

O melanoma é um tipo de câncer de pele agressivo e seu tratamento enfrenta diversos limitantes, como a resistência terapêutica. As (1→3)(1→6)-β-D-glucanas, principalmente as de origem fúngica, estimulam a resposta imunológica através de interação com receptores de reconhecimento padrão, sendo consideradas adjuvantes promissores no tratamento do câncer. O objetivo desta pesquisa foi avaliar se a (1→3)(1→6)-β-D-glucana extraída da parede celular de *S. cerevisiae* (Wellmune, WM) e a produzida pelo fungo ascomiceto *B. rhodina* (Botriosferana, BOT) apresentavam ação antitumoral no melanoma murino B16-F10. Para isso, camundongos C57BL/6 fêmeas foram inoculados com 2×10^5 células de melanoma B16-F10 no tecido subcutâneo e tratados a partir do 5º dia pós implantação tumoral, seguido de tratamentos a cada 3 dias até a eutanásia no 17º dia. Os tratamentos foram realizados por via oral ou intraperitoneal (IP) com salina (grupo controle), 30 mg/kg de BOT (BOT oral ou IP), ou 30 mg/kg de WM (WM oral ou IP). O grupo BOT oral apresentou diminuição do volume tumoral a partir do 14º dia comparado ao grupo controle, enquanto nos grupos WM oral e WM IP esse efeito foi observado apenas no 17º dia. O tratamento com a BOT IP não alterou o volume tumoral quando comparado ao controle. Apenas no grupo BOT oral foi observada diminuição do peso tumoral no 17º dia comparado ao grupo controle ($p=0,005$), embora todos os protocolos de tratamento tenham diminuído o índice mitótico de maneira estatisticamente significativa. Não foram observadas alterações na avaliação semiquantitativa da área de necrose tumoral. Em relação aos níveis de citocinas produzidas no microambiente tumoral (TME), observamos que IFN-γ aumentou três vezes no grupo BOT oral em relação ao grupo controle. A expressão de mRNA de *Ifnb1* aumentou no grupo WM oral comparado ao grupo controle. Para determinar a influência de TLR2, TLR4 e IFN-γ, aplicamos o mesmo modelo experimental em camundongos *knockouts* para a produção dessas moléculas. Foi observado que a diminuição do peso tumoral ao final do tempo experimental é dependente do receptor TLR4 para o tratamento com a BOT oral. Ainda, a ausência do receptor TLR4 provocou o aumento do peso tumoral no grupo WM oral comparado ao grupo controle. O efeito antiproliferativo da BOT e da WM administradas por via oral se mostrou dependente da citocina IFN-γ. Os resultados deste estudo mostraram que o

efeito antitumoral da BOT é dependente da via de administração oral e do receptor TLR4. Além disso, a ausência desse receptor foi capaz de estimular o crescimento do melanoma B16-F10 subcutâneo no grupo WM oral. A ação antiproliferativa da BOT e da WM se mostrou dependente de IFN- γ . Esses achados reforçam o potencial das β -glucanas como adjuvantes imunomoduladores no tratamento do melanoma e destacam a importância de TLR4 e IFN- γ na mediação de sua atividade biológica.

Palavras-chaves: Melanoma, (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas,, Imunoterapia, *Saccharomyces cerevisiae*, *Botryosphaeria rhodina*, receptores Toll-like, IFN- γ

Abstract

Melanoma is an aggressive type of skin cancer, and its treatment faces several limitations, such as therapeutic resistance. (1→3)(1→6)- β -D-glucans, especially those of fungal origin, stimulate the immune response through interaction with pattern recognition receptors and are considered promising adjuvants in cancer treatment. The objective of this study was to evaluate whether the (1→3)(1→6)- β -D-glucan extracted from the cell wall of *S. cerevisiae* (Wellmune, WM) and that produced by the ascomycete fungus *B. rhodina* (Botryosphaeran, BOT) exhibited antitumor activity against murine B16-F10 melanoma. To this end, female C57BL/6 mice were subcutaneously inoculated with 2×10^5 B16-F10 melanoma cells and treated starting on the 5th day post-tumor implantation, followed by treatments every 3 days until euthanasia on day 17. Treatments were administered either orally or intraperitoneally (IP) with saline (control group), 30 mg/kg of BOT (oral or IP), or 30 mg/kg of WM (oral or IP). The BOT oral group showed a reduction in tumor volume starting from day 14 compared to the control group, while in the WM oral and WM IP groups this effect was only observed on day 17. BOT administered intraperitoneally did not affect tumor volume compared to the control. A reduction in tumor weight on day 17 was observed only in the BOT oral group compared to the control ($p = 0.005$), although all treatment protocols significantly reduced the mitotic index. No changes were observed in the semiquantitative evaluation of the tumor necrosis area. Regarding cytokine levels in the tumor microenvironment (TME), IFN- γ increased threefold in the BOT oral group compared to the control group. mRNA expression of *Ifnb1* increased in the WM oral group compared to the control. To determine the influence of TLR2, TLR4, and IFN- γ , the same experimental model was applied in knockout mice for these molecules. Tumor weight reduction by the end of the experimental period was found to be dependent on the TLR4 receptor in the BOT oral treatment group. Moreover, the absence of TLR4 led to increased tumor weight in the WM oral group compared to the control. The antiproliferative effect of orally administered BOT and WM was shown to be dependent on the cytokine IFN- γ . The results of this study demonstrated that the antitumor effect of BOT depends on oral administration and the TLR4 receptor. Furthermore, the absence of this receptor was capable of promoting the growth of subcutaneous B16-F10 melanoma in the WM oral group. The

antiproliferative action of BOT and WM was shown to be dependent on IFN- γ . These findings reinforce the potential of β -glucans as immunomodulatory adjuvants in melanoma treatment and highlight the importance of TLR4 and IFN- γ in mediating their biological activity.

Keywords: Melanoma, (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans, Immunotherapy, *Saccharomyces cerevisiae*, *Botryosphaeria rhodina*, Toll-like receptors, IFN- γ

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Incidência (A) e mortalidade (B) estimadas e ajustadas por idade do melanoma cutâneo no mundo em 2020.

Figura 2. Inibidores de BRAF e MEK usados para tratar pacientes com melanoma.

Figura 3. Inibidores de checkpoint imunológico direcionados à via PD-1/PD-L1/2.

Figura 4. Processos Reguladores Imunes do Microambiente Tumoral.

Figura 5. Origem dos TAMs e suas interações com o microambiente tumoral.

Figura 6. Visão geral das vias de sinalização do receptor Toll-like (TLR).

Figura 7. Vias de sinalização dos interferons que mediam respostas antitumorais.

Figura 8. Vias direta e indireta de reconhecimento do câncer.

Figura 9. Estrutura química de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas de interesse médico obtidas de diferentes fontes.

Figura 10. Vias de atuação das (1→3)(1→6)-β-D-glucana.

Figura 11. Ação dos tratamentos com (1→3)(1→6)-β-D-glucanas no crescimento e no peso tumoral do melanoma B16-F10 subcutâneo em camundongos C57BL/6.

Figura 12. Imagens representativas da necrose e índice mitótico no tecido tumoral.

Figura 13. Ação dos tratamentos com (1→3)(1→6)-β-D-glucanas na expressão de genes relacionados à resposta imune no melanoma subcutâneo em animais WT.

Figura 14. Ação dos tratamentos com (1→3)(1→6)-β-D-glucanas no peso tumoral do melanoma B16-F10 subcutâneo em camundongos C57BL/6 *knockouts* para TLR2, TLR4 e IFN-γ^{-/-}.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Papeis de diferentes subtipos de células na imunidade antitumoral e inflamação promotora de tumor.

Tabela 2. Estrutura química de diferentes (1→3)(1→6)-β-D-glucanas e seu efeito imunomodulador geral in vivo

Tabela 3. Níveis de citocinas intratumorais nos tumores subcutâneos de melanoma B16-F10 de animais tratados ou não com as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas

Quadro 1. Sequências de primers utilizados na análise por qPCR de genes relacionados a resposta imune.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AKT – Proteína quinase B

APCs – do inglês *Antigen-Presenting Cells*

B16-F10 – Linhagem celular de melanoma murino

BALB/c – Linhagem de camundongo albino de laboratório

BAX – Proteína pró apoptótica Bcl-2-associada X

BG136 – (1→3)(1→6)-β-D-glucana derivada da alga *Durvillaea antarctica*

BOT – (1→3)(1→6)-β-D-glucana produzida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.

BRAF-600 – *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*

C57BL6 – Sub-linhagem 6 da linha 57 de camundongos de pelagem preta da série C, criada pelo Dr. C.C. Little

CD28 – Grupo de Diferenciação 28

CD80 – Molécula co estimulatória B7-1

CD86 – Molécula co estimulatória B7-2

CDK6 – Quinase dependente de ciclina 6

COT – Tumor Oncogênico COT (ou MAP3K8 – serina/treonina quinase)

CR3 – Receptor do complemento tipo 3

CRAF – Proto-oncogene serina/treonina-quinase RAF1

CTLA-4 – Antígeno-4 citotóxico de linfócito T

CTLs – Linfócitos T citotóxicos

DBA – Linhagem de camundongos (*Dilute Brown non-Agouti*)

DCs – Células dendríticas

DIP – (1→3)(1→6)-β-D-glucana solúvel extraída do cogumelo da espécie *Dictyophora indusiata*

DITC – Dacarbazina

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

ERK – do inglês *Extracellular signal-Regulated Kinase*

FASL – do inglês *FAS Ligand*

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

FOXN1 – Fator de transcrição Forkhead box N1

GEM – do inglês *Genetically Engineered Mice*

GTP – Guanina trifosfato

HLA – do inglês *Human Leukocyte Antigen*

ICR – do inglês *Institute of Cancer Research*

IFN – Interferon

IFN α – Interferon-alfa

IFN- γ – Interferon-gama

IL1B – Interleucina 1 beta

IL1 – Interleucina 1

IL2 – Interleucina 2

IL4 – Interleucina 4

IL5 – Interleucina 5

IL6 – Interleucina 6

IL8 – Interleucina 8

IL10 – Interleucina 10

IL12 – Interleucina 12

IL13 – Interleucina 13

IL17 – Interleucina 17

IL23 – Interleucina 23

ILCs – do inglês *Innate Lymphoid Cells*

INF- β – Interferon-beta

iNOS – do inglês *Inducible Nitric Oxide Synthase*

ITIM – do inglês *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*

JAK-STAT – Vias de sinalização Janus kinase (*Signal Transducer and Activator of Transcription*)

K7 – Citoqueratina 7

LPS – Lipopolissacarídeo

M1 – Macrófago tipo 1

M2 – Macrófago tipo 2

M2-luc2 – Variante de linhagem M2 expressando luciferase (*M2-luciferase 2*)

mAbs – do inglês *Monoclonal Antibodies*

MAC1 – do inglês *Macrophage-1 antigen, CD11b/CD18*

MAPK – do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MDR – do inglês *Multidrug Resistance*

MDSCs – do inglês *Myeloid-Derived Suppressor Cells*

MEK – Quinase de ativação da proteína quinase ativada por mitógeno

MHC – do inglês *Major Histocompatibility Complex*

miR – MicroRNA

MRB – Modificadores de resposta biológica

mTOR – do inglês *mammalian (or mechanistic) Target Of Rapamycin*

MyD88 – do inglês *Myeloid Differentiation Primary Response 88*

NF1 – Neurofibromin 1

NFkB – Fator nuclear kappa B

NK – do inglês *natural killer*

NKT – Células Natural Killer T

p16 – Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A)

p21 – Inibidor de ciclo celular Cip1

p27Kip – Inibidor de ciclo celular p27 (Kip1)

p65 – Subunidade p 65 do NF-kB

PAMPS – do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PD0325901 – Inibidor de MEK

PD-1 – do inglês *Programmed Cell Death Protein1*

PD-L1 – do inglês *Programmed Death-Ligand 1*

PD-L2 – do inglês *Programmed Death-Ligand 2*

PGE2 – Prostaglandina E2

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PRRs – do inglês *Pattern Recognition Receptors*

RAF – do inglês *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

RAS – do inglês *Rat Sarcoma*

ROS – do inglês *Reactive Oxygen Species*

RTKs – do inglês *Receptor Tyrosine Kinases*

S. Cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

S91 – Linhagem de melanoma murino S91

SG – Sobrevida Global

TAMs – do inglês *Tumor-Associated Macrophages*

TCD4 – Linfócito T auxiliar CD4+

TCD8 – Linfócito T CD8+

TGF- β – do inglês *Transforming Growth Factor Beta*

TH1 – célula T auxiliar 1

TH17 – célula T auxiliar 17

TH2 – célula T auxiliar 2

TIGIT – do inglês *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*

TIM-3 – do inglês *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*

TLR – Receptor tipo Toll

TME – Microambiente Tumoral

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TRAIL – do inglês *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

TREG – do inglês *T Regulatory Cells*

UV – Ultravioleta

VEGF – do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

WGP – do inglês *Whole Glucan Particles*

WNT – do inglês *Wingless-related integration site*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Melanoma	21
2.1.2 Tratamento farmacológico do melanoma cutâneo	26
2.1.3 Principais modelos experimentais murinos para o estudo do melanoma	33
2.1.3.1 Modelos de transplante de xenoenxerto	34
2.1.3.2 Modelos de transplante singênico	35
2.1.3.3 Modelos geneticamente modificados	36
2.2 Resposta imune antitumoral	37
2.2.1 Imunoedição do câncer	38
2.2.2 Principais células imunes envolvidas no câncer	40
2.2.3 Principais citocinas envolvidas	41
2.3 (1→3)(1→6)-β-D-glucanas	52
2.3.1 Imunomodulação por (1→3)(1→6)-β-D-glucanas	53
2.3.2 Ação antitumoral de β-glucanas	62
3. JUSTIFICATIVA	64
4. OBJETIVO GERAL	65
4.1 Objetivos específicos	65
5. MATERIAIS E MÉTODOS	66
5.1 Obtenção de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas	66
5.2 Animais Experimentais e delineamento experimental	67
5.3 Cultura de células tumorais	67
5.4 Modelo murino de melanoma subcutâneo	68
5.5 Delineamento experimental e avaliação do crescimento tumoral	68
5.6 Análises histopatológicas	69
5.7 Análise do perfil de citocinas intratumorais por Citometric Bead Array (CBA)	69
5.8 Expressão de genes relacionados à resposta imune antitumoral	70
5.9 Análise estatística	71
6. RESULTADOS	72
6.1 A ação antitumoral da Botriosferana é dependente da via de administração oral	72
6.2 O tratamento por via oral com Botriosferana aumenta a produção de IFN-γ e Wellmune oral aumenta a expressão genica de IFN tipo I no microambiente tumoral	76
6.3 A ação antitumoral da Botriosferana e da Wellmune é dependente de receptores TLR2, TLR4 e IFN-γ	79
7. DISCUSSÃO	81
8. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89
ANEXO 1	115
APÊNDICE 1	116

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de neoplasia maligna cutânea agressiva originada dos melanócitos, células responsáveis pela produção do pigmento melanina (Ugurel; Guztmer, 2023). Apesar de representar apenas 1% dos cânceres de pele, o melanoma é responsável por mais de 80% das mortes por câncer neste órgão devido ao seu alto potencial de metastatização (Saginala *et al.*, 2021). O estágio do câncer no momento do diagnóstico é um fator determinante para o tratamento, e exerce uma influência significativa na sobrevida do paciente. Na doença avançada, onde apenas a remoção cirúrgica da lesão não é suficiente, as principais limitações terapêuticas são a ocorrência de eventos adversos, que podem levar a toxicidade cutânea e gastrointestinal, frequentemente associada a respostas imunológicas indesejadas e à falta de seletividade das terapias para as células tumorais, e a diminuição da eficácia terapêutica, que é comum até mesmo nos tratamentos mais modernos, como terapias alvo e inibidores de *check-point* imunológico (Domingues *et al.* 2018), o que torna urgente o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença.

Substâncias chamadas de imunomoduladores demonstram ter capacidade de modificar a dinâmica das células de defesa frente a uma ameaça ao organismo. Dessa forma, diferentes substâncias naturais – como proteínas e aminoácidos - mostram regulação significativa sobre o recrutamento e atividade dessas células (Saroj *et al.*, 2012). Um exemplo disso, são as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas caracterizadas como um grupo diversificado de polissacarídeos complexos que são encontrados na composição de fungos, plantas, bactérias e algas marinhas (Soltanian *et al.*, 2009). Elas possuem variadas aplicações terapêuticas, sendo a imunomodulação exercida principalmente por (1→3)(1→6)-β-D-glucanas com ligações do tipo β-(1→3)(1→6) de origem fúngica. Essas moléculas podem ser classificadas como imunoadjuvantes, já que possuem a capacidade de modulação na resposta das células T e células B, potencializando a resposta imune frente às vacinas, e também como imunoestimulantes, modulando a resposta imune inata e resposta imune adaptativa (Kim *et al.*, 2011).

As células imunes reconhecem as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas como padrões

moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Thomas *et al.*, 2022). Sabe-se que a vinculação das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas aos receptores de neutrófilos, monócitos, células natural killer (NK), e principalmente macrófagos e células dendríticas, induz a produção de várias citocinas inflamatórias que ativam indiretamente outras células de defesa, como os linfócitos T e B (Kim *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2021). Quando comparado a outros imunomoduladores, as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas apresentam algumas vantagens, como a ausência de imunogenicidade devido à falta de componentes proteicos e peptídicos, sua não toxicidade e especificidade na potencialização da resposta imunológica, atuando em receptores específicos (Mishra *et al.*, 2023). Essas propriedades de potencialização imunológica têm sido exploradas para o desenvolvimento das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas como adjuvantes na imunoterapia do câncer, visando melhorar a resposta imunológica (Mishra *et al.*, 2023).

Vale ressaltar que seus efeitos biológicos variam amplamente conforme a fonte e o processo de obtenção, que influenciam na estrutura de ramificação, peso molecular, pureza e conformação tridimensional e na interação com receptores do sistema imune, como Dectin-1 e CR3. Assim, a origem e o método de obtenção determinam não apenas a potência, mas também o perfil da resposta biológica, tornando fundamental caracterizar a β-glucana bem como seus efeitos biológicos em diferentes tipos de doenças. Uma importante fonte destes polissacarídeos é a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura amplamente empregada em processos industriais de fermentação (Magnani; Castro-Goméz, 2008), que exibe atividade anticancerígena *in vitro* e *in vivo* (Kim *et al.*, 2010) que é atóxica para células normais de camundongos (MO *et al.*, 2017). Enquanto a Botriosferana é uma (1→3)(1→6)-β-D-glucana (BOT) exocelular com aproximadamente 22% de ramificações e conformação tripla hélice, produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 quando cultivado em glucose como fonte única de carbono (Dekker *et al.*, 2019). Apesar dos poucos estudos e mecanismos pouco compreendidos sobre sua ação anti-inflamatória, é reconhecida sua atividade imunomoduladora (Silva *et al.*, 2022). Quanto a ação antitumoral, a administração oral da BOT no modelo experimental de tumor de Walker, um tipo de carcinosarcoma em ratos foi capaz de diminuir em 30% o volume tumoral, além de atenuar a caquexia oncológica em ratos obesos (Comiran *et al.*, 2021). Diante do

reconhecido potencial terapêutico das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas provenientes de diferentes fontes, torna-se essencial aprofundar o entendimento sobre seus mecanismos de ação imunológica e antitumoral. A escassez de estudos relacionados aos seus efeitos biológicos, especialmente em modelos tumorais, reforça a importância de investigações que avaliem sua eficácia e segurança.

Nesse contexto, o presente estudo propõe analisar os efeitos imunomoduladores e antitumorais de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas oriundas de distintas fontes em modelos experimentais, contribuindo para a elucidação de seu potencial como composto bioativo acessível, com aplicações promissoras no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Destaca-se, em especial, a Botriosferana, cuja principal vantagem é a facilidade e o menor custo de produção em comparação às (1→3)(1→6)-β-D-glucanas disponíveis no mercado, uma vez que é liberada diretamente no meio de cultivo sob condições de fermentação (Dekker *et al.*, 2019).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Melanoma

O melanoma é uma neoplasia maligna originada dos melanócitos, células pigmentares derivadas do neuroectoderma, presentes em diferentes tecidos. O melanoma pode afetar tanto os humanos quanto outras espécies, sendo particularmente comum em cães. Nos cães, os melanomas são frequentemente encontrados na cavidade oral (62%), na pele (27%), na pele interdigital (6%) e sob as unhas (4%). O melanoma oral é a neoplasia maligna mais comum na cavidade oral, representando até 45,5% de todos os tumores orais nessa espécie (Polton *et al.*, 2024). Embora raros, os tumores melanocíticos também afetam os gatos, representando menos de 1% de todos os casos de câncer. Eles correspondem de 0,8% a 7% dos tumores de pele e menos de 1% dos tumores orais em felinos (Polton *et al.*, 2024). Nos equinos, os tumores melanocíticos geram grande preocupação entre proprietários e veterinários devido às suas implicações econômicas e de saúde. Cerca de 80% dos tumores em cavalos afetam a pele, dos

quais 15% são melanocíticos. Embora mais de 90% destes tumores sejam benignos, aproximadamente 66% podem evoluir para formas malignas com potencial para metastatizar (Pimenta; Prada; Cotovio, 2023).

Em humanos, o melanoma cutâneo representa a maior parte dos diagnósticos de melanoma (>90%) em populações majoritariamente brancas, enquanto melanomas de origem mucosa e uveal são mais raros (<1-5% dos diagnósticos, com variação por país) (Long et al., 2023). Este câncer é responsável por aproximadamente 75% dos óbitos associados ao câncer de pele, tendo sua incidência global variando entre 15 e 25 casos a cada 100.000 indivíduos. As taxas de incidência e mortalidade do melanoma variam consideravelmente em diferentes regiões do mundo. Em 2015, foram registrados 351.880 casos globais de melanoma e 62.000 mortes em decorrência da doença. O número de casos aumentou de 232.000 em 2012 para 351.880 em 2015, o que pode ser, em parte, atribuído a melhorias nos sistemas de registro de câncer (Cirillo, 2025).

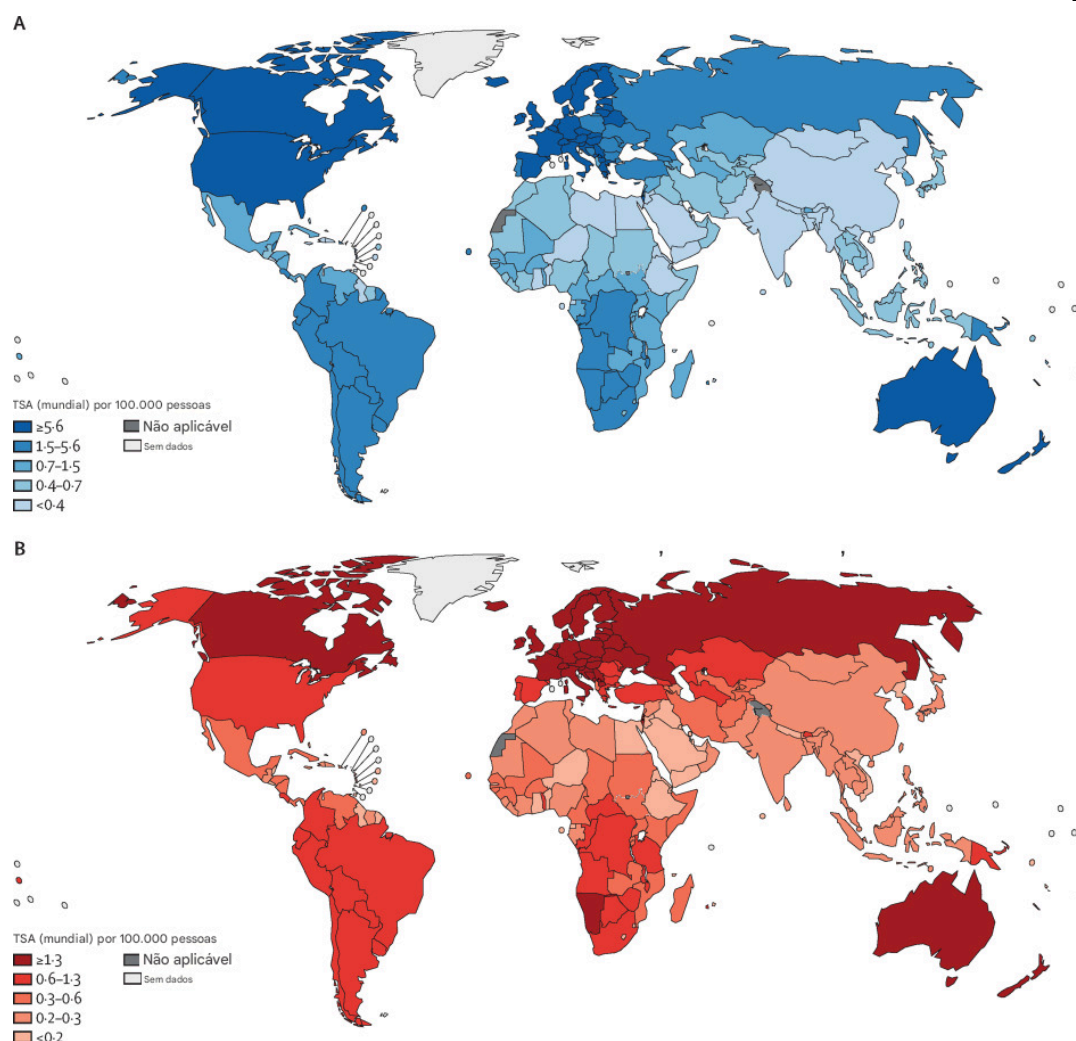


Figura 1. Incidência (A) e mortalidade (B) estimadas e ajustadas por idade do melanoma cutâneo no mundo em 2020. TSA = taxa ajustada por idade (age-standardised rate). Fonte: Long *et al.*, 2023.

A exposição à radiação ultravioleta (UV) constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença, resultando em alterações genéticas características dessa neoplasia (Schadendorf *et al*, 2015). As maiores incidências do melanoma cutâneo ocorrem em países com maiores índices de radiação ultravioleta e com população predominante de pele clara, como Austrália (34,9 por 100.000 pessoas-ano) e Nova Zelândia (35,8 por 100.000 pessoas-ano) (SSchadendorf *et al*, 2015). Em países com predomínio de populações sem descendência europeia, como os da Ásia, África e América Latina, destaca-se uma

maior frequência de melanoma de mucosa e de melanoma cutâneo do subtipo acral lentiginoso, que não são associados à radiação ultravioleta (Ossio et al., 2017).

O diagnóstico do melanoma é realizado por meio de avaliação histopatológica, sendo as decisões terapêuticas subsequentes fundamentadas na classificação histológica e na análise do risco. Para os tumores cutâneos, a classificação baseia-se na espessura do tumor (sistema de Breslow), no envolvimento linfonodal e na presença de metástases à distância. De acordo com o sistema de Breslow, a espessura do tumor é o critério prognóstico mais importante, orientando o planejamento do tratamento, incluindo a definição das margens cirúrgicas adequadas e a indicação para biópsia do linfonodo sentinela. A presença de ulceração é outro marcador histopatológico significativo, associado a um prognóstico desfavorável (Schadendorf et al, 2018).

O estadiamento do melanoma é crucial pois fornece uma nomenclatura padronizada, permite a classificação dos pacientes em grupos de risco, auxilia na estratificação de ensaios clínicos, facilita a comparação de resultados entre centros e serve como base para decisões clínicas (Balch et al., 2004). Os estágios clínicos I e II são definidos pela ausência de metástases, tanto regionais quanto distantes, com base em avaliação clínica, radiológica e laboratorial. O estágio III envolve metástases regionais, como linfonodos afetados ou metástases intra linfáticas, como satelitoses ou em trânsito, sendo a avaliação dos linfonodos uma tarefa desafiadora. O estágio IV é caracterizado por metástases em órgãos distantes, sem subdivisão adicional (Ward et al., 2020). A taxa de sobrevida em 5 anos para melanomas localmente invasivos é de 98%, enquanto para metástases regionais é de 64% e para metástases à distância é de 23% (Cortez; Vasquez; Wei, 2021). A prevenção, detecção precoce e o uso de tratamentos adjuvantes eficazes no melanoma em estágio III têm aumentado as taxas de sobrevida e cura. Com o uso de tratamentos baseados em PD-1 e agentes direcionados ao melanoma mutante BRAF V600, as taxas de sobrevida global de 5 anos para melanoma metastático aumentaram em países com acesso a essas inovações. No entanto, pacientes com alta carga tumoral, metástase cerebral e níveis elevados de lactato desidrogenase

ainda apresentam um prognóstico desfavorável, com sobrevida em 3 anos inferior a 10% (Schadendorf et al., 2018).

As opções terapêuticas para o melanoma cutâneo são determinadas pelas características do tumor, incluindo localização, estágio e perfil genético. As principais abordagens disponíveis incluem ressecção cirúrgica, terapia sistêmica, e radioterapia. O procedimento cirúrgico é adaptado com base nas características clínico-patológicas da neoplasia, sendo no geral recomendadas margens de segurança de 0,5 cm para melanomas in situ, 1 cm para tumores com espessura de até 2 mm e 2 cm para aqueles com espessura superior a 2 mm (Curti; Faries, 2021). A dissecação eletiva de linfonodos, que consiste na remoção de linfonodos regionais em pacientes com melanoma sem metástases regionais clinicamente detectáveis está associada a complicações clinicamente relevantes. O papel dessa abordagem permaneceu controverso até o desenvolvimento da biópsia do linfonodo sentinela, o que questionou a necessidade dessa dissecação. Com a biópsia do linfonodo sentinela, apenas os linfonodos responsáveis pela drenagem linfática direta do tumor são removidos, evitando a dissecação completa em grande parte dos pacientes. Essa estratégia reduz a morbidade, como o linfedema, e melhora a precisão do estadiamento, proporcionando uma avaliação mais acurada da doença nodal (Curti; Faries, 2021).

Historicamente resistente à quimioterapia e com sobrevida global em 5 anos de aproximadamente 17% no início dos anos 2000 (Yang; Chapman, 2009), o tratamento do melanoma metastático passou por uma transformação significativa na última década com o avanço da terapia molecular direcionada e da imunoterapia. Mas apesar dos avanços alcançados, ainda são necessárias abordagens terapêuticas adicionais para pacientes que apresentam resistência aos tratamentos disponíveis (Jenkins; Fisher, 2021). Ademais, o tratamento sistêmico do melanoma apresenta três principais limitações: (1) eventos adversos (EAs), frequentemente associados à toxicidade cutânea e gastrointestinal, decorrentes de reações imunológicas exacerbadas e da falta de especificidade para células tumorais; (2) redução da eficácia terapêutica, frequentemente relacionada à resistência também a estratégias imunológicas e de terapias-alvo (Dhanyamraju;

Patel, 2022); (3) por fim, outra importante limitação é que o tratamento de primeira linha para o melanoma cutâneo, incluindo no Brasil, é de difícil acesso para grande parte da população devido seu alto custo (Da Veiga et al., 2021; Cortez; Vasquez; Wei, 2021).

2.1.2 Tratamento farmacológico do melanoma cutâneo

Para potencializar a sobrevida, terapias adjuvantes como imunoterapia e terapia-alvo são indicadas principalmente para os pacientes com doença local avançada (estadiamento clínico IIb e IIc) e doença regionalmente avançada (estadiamento clínico III) (Long et al., 2023). A imunoterapia de checkpoint anti-PD-1 e a terapia direcionada ao BRAF são atualmente os tratamentos adjuvantes padrão para pacientes com melanoma ressecável de alto risco, demonstrando a capacidade de reduzir o risco de recidiva e melhorar a sobrevida sem metástases à distância. No entanto, o impacto desses tratamentos na sobrevida global ainda não foi comprovado (Long et al., 2023). Atualmente, um em cada dois pacientes com melanoma estadiamento clínico IV sobrevive por cinco anos após o diagnóstico quando tratado com imunoterapia combinada (Larkin et al., 2019), e mais de um em cada três pacientes após anos de terapia direcionada combinada BRAF/MAPK quinase (MEK) ou bloqueio PD-1 de agente único (Robert et al., 2019).

A quimioterapia foi a primeira abordagem terapêutica para o melanoma avançado. Apesar das recentes descobertas de novas opções terapêuticas, a quimioterapia com a dacarbazina segue sendo um tratamento importante no manejo paliativo de melanomas refratários, progressivos e recidivantes (Domingues et al., 2018). A dacarbazina é um agente alquilante aprovado pela FDA em 1974 e é o tratamento quimioterápico padrão para o melanoma metastático. Estudos indicaram que a resposta completa é alcançada em menos de 5% dos casos, e a sobrevida em 5 anos para esse grupo de pacientes varia entre 2% e 6%. Apesar desses resultados, a dacarbazina permaneceu como o padrão terapêutico, pois

outras terapias isoladas ou em combinações não mostraram melhorias na sobrevida global (SG) dos pacientes (Kim et al., 2010). No entanto, diversos ensaios clínicos em melanoma ainda estão em andamento utilizando a dacarbazina como comparação ou em combinação com outras quimioterapias, imunoterapias e terapias direcionadas (Domingues et al., 2018). Atualmente, a dacarbazina é considerada terapia de última linha para o melanoma metastático, sendo preferencialmente reservada aos pacientes com baixa resposta terapêutica à imunoterapia e que não podem se beneficiar do uso de terapias alvo (Rydén et al., 2023).

O BRAF é uma serina-treonina quinase essencial na via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), e mutações neste gene estão presentes em mais da metade dos pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo (Sullivan et al., 2015). Mutações no gene BRAF estão associadas à ativação constitutiva da via de sinalização MAPK, resultando em um aumento no crescimento e proliferação de células tumorais (Ballantyne; Garnock-Jones, 2015). Essa via desempenha um papel crucial no desenvolvimento de tumores em diversos tipos de câncer, através da desregulação da cascata de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK. As proteínas da família RAS, quando ligada ao GTP, ativam as proteínas RAF, que são compostas pelas serina-treonina quinases ARAF, BRAF e CRAF (RAF-1). O RAF tipo selvagem funciona formando homo ou heterodímeros com as isoformas ARAF, BRAF e CRAF. As proteínas RAF fosforilam e ativam as quinases MEK1 e MEK2, que, por sua vez, fosforilam e ativam ERK1 e ERK2. Esse processo resulta na ativação de fatores de transcrição que regulam a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (Hertzman; Egyhazi, 2014). Atualmente, três inibidores seletivos da quinase BRAF foram aprovados para o tratamento do melanoma com mutação no BRAF, sendo eles vemurafenibe, dabrafenibe e encorafenibe. Esses medicamentos são inibidores seletivos de quinase BRAF disponíveis por via oral. Ao inibir o BRAF, eles interferem na via de sinalização MAPK, responsável pela regulação da proliferação e sobrevivência das células do melanoma (Savoia et al., 2019). Como um mediador essencial na formação do melanoma induzido por oncogenes, o MEK contribui para a transformação celular e

a inibição da apoptose por meio de mecanismos transcricionais e pós-traducionais. Evidências indicam que a inibição do MEK reduz a proliferação e a invasão de células de melanoma humano com a mutação BRAF V600E in vitro, além de diminuir o crescimento tumoral in vivo (Wang; Qi, 2013). Os principais inibidores da via BRAF e MEK utilizados no tratamento do melanoma cutâneo estão representados na Figura 2.

Um desafio significativo no uso desses inibidores e no avanço das terapias para melanoma é a resistência, seja intrínseca ou adquirida, atribuída a perfis mutacionais complexos e alterações genéticas concomitantes (Poulikakos et al., 2010). A resistência intrínseca refere-se à falta de resposta imediata ao tratamento inicial, resultante de mutações pré-existentes ou interações entre células tumorais e o microambiente (Straussman et al., 2012). A resistência adquirida aos inibidores de BRAF ocorre na maioria dos pacientes após uma resposta inicial, sendo associada principalmente a mutações em NRAS e MEK1 (Wang; Qi, 2013). A associação de inibidores de BRAF com outros agentes direcionados à via MAPK pode não apenas atrasar ou evitar a resistência, mas também reduzir os efeitos colaterais. Um estudo comparando a combinação do inibidor de BRAF dabrafenibe com o inibidor de MEK trametinibe versus dabrafenibe isolado mostrou uma redução não significativa das lesões cutâneas (Flaherty et al., 2012). Entretanto, essa terapia combinada demonstrou um aumento significativo na sobrevida livre de progressão em relação ao uso exclusivo do inibidor de BRAF (Flaherty et al., 2012), e é comumente utilizada na prática clínica (Long et al., 2023).

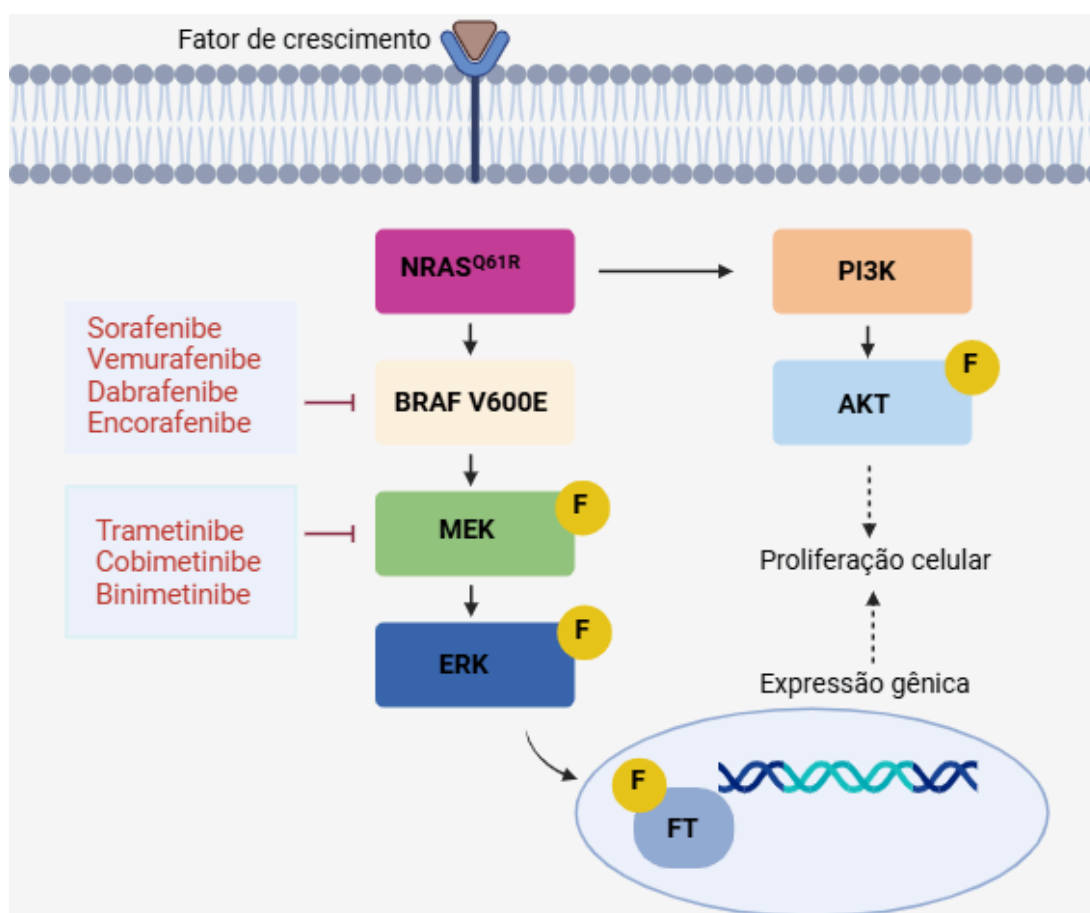


Figura 2. Inibidores de BRAF e MEK usados para tratar pacientes com melanoma. Mutações nos genes que codificam proteínas das famílias RAS, RAF e MEK promovem a ativação constitutiva de vias de sinalização associadas à proliferação celular, notadamente as vias ERK (extracellular signal-regulated kinase) e AKT. Essa ativação aberrante favorece a expressão de fatores de transcrição que regulam processos celulares essenciais, como proliferação, sobrevivência e diferenciação. Atualmente, encontram-se aprovados para o tratamento do melanoma fármacos inibidores seletivos direcionados às formas mutadas das proteínas BRAF (particularmente a mutação V600E) e MEK. ERK: quinase regulada por sinal extracelular. MEK: quinase de proteína ativada por mitógeno. AKT: proteína quinase B. PI3K: quinase fosfoinosítideo-3. F: fosforilado. NRAS: proteína GTPase da família RAS. BRAF: proteína quinase serina-treonina pertencente à família RAF. **Fonte:** Adaptado de Li *et al.*, 2022.

A hipótese de que o câncer e o sistema imunológico estão relacionados se iniciou no século 19, baseado nas observações de que tumores frequentemente se desenvolviam em locais de inflamação crônica e que as células imunes estavam

presentes nos tecidos tumorais (Balkwill; Mantovani, 2001). Nas respostas antitumorais, as células T reconhecem antígenos específicos do tumor, o que leva à sua ativação, seguida de proliferação e diferenciação, adquirindo a capacidade de destruir células que possuem esses antígenos (Sharma; Allison, 2015). Em 1995, o interferon (IFN)- α 2b foi o primeiro agente aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA, Estados Unidos) para terapia adjuvante, demonstrando eficácia na redução da recorrência da doença e da mortalidade em pacientes de alto risco. Já em 1998, a interleucina-2 (IL-2) se tornou o primeiro agente de imunoterapia aprovado para o tratamento de melanoma metastático avançado, embora seu uso tenha sido restrito devido à toxicidade significativa (Davar et al., 2017). Antes de 2011, o tratamento imunoterápico padrão para melanoma estava limitado ao uso de IFN- α 2b para doenças primárias ou regionais com alto risco de recorrência, e altas doses de IL-2 para formas avançadas ou metastáticas. Com base no sucesso observado em modelos in vitro de células tumorais murinas com linfócitos ativados por IL-2, a intenção era que a infusão de altas doses de IL-2 promovesse a geração de linfócitos citotóxicos ativados pela citocina também in vivo (Haanen, 2013). No entanto, essas altas doses de IL-2 resultavam em taxas de resposta objetiva de apenas 16% e uma taxa de resposta completa de 6% (Weiss; Wolchoj; Sznol, 2019). Para pacientes com melanoma completamente ressecado e alto risco de recorrência, o tratamento adjuvante inclui IFN- α 2b ou IFN peguillado. No entanto, esses agentes foram frequentemente associados a efeitos adversos persistentes e desconfortáveis, oferecendo apenas um benefício modesto na sobrevida livre de recorrência e uma leve melhoria na sobrevida global (Eggermont et al., 2012).

Além das vias de sinalização estimuladoras e inibidoras que restringem a eficácia das respostas antitumorais das células T, as células cancerígenas podem evitar a ativação dessas células (Sharma; Allison, 2015). As células de melanoma podem evadir o reconhecimento pelo sistema imunológico por meio da regulação positiva das moléculas de checkpoint imunológico, que também desempenham um papel fisiológico na limitação das respostas imunes, como observado em infecções virais (Zaremba et al., 2020). O CD28, identificado em 1986, foi a primeira molécula

co-estimulatória descoberta, ligando-se a CD80/CD86 nas células apresentadoras de antígenos (APCs). Essa interação pode ser bloqueada pelo CTLA-4, que também se liga a CD80/CD86 com maior afinidade do que o CD28, inibindo a sinalização co-estimulatória (Hurst, 2015). A terapia adjuvante com ipilimumabe (anticorpo anti-CTLA-4) foi a primeira imunoterapia de checkpoint a mostrar benefícios estatisticamente significativos e clinicamente relevantes na sobrevida livre de recorrência e na sobrevida global em melanoma ressecado em estágio III, quando comparada ao placebo. No entanto, devido ao seu perfil de segurança desfavorável, não foi estabelecida como terapia padrão (Long et al., 2023).

A via de sinalização JAK-STAT é um regulador crucial da molécula de checkpoint imunológico PD-1. No processo de reconhecimento do antígeno tumoral pelas células T, o IFN- γ é secretado por essas células, o que ativa a expressão mediada pela via JAK-STAT dos ligantes PD-1 (PD-L1 e PD-L2) na superfície das células de melanoma. A interação de PD-L1 e PD-L2 com o receptor de superfície PD-1 resulta na supressão da atividade efetora das células T (Figura 3). A inibição das moléculas de checkpoint imunológico, como a PDL-1 e CLTA-4, pode levar à ativação do sistema imunológico e ao reconhecimento da célula tumoral (Zaremba et al., 2020). O uso de anticorpos monoclonais (mAbs) bloqueadores de CTLA-4 e PD-1 demonstrou atividade clínica superior a qualquer terapia disponível anteriormente, revolucionando o tratamento de pacientes com melanoma. (Wolchok et al., 2013).

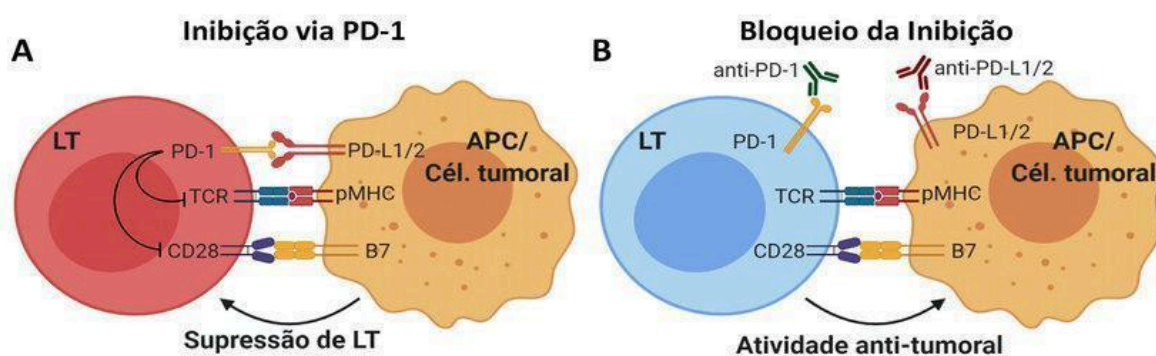


Figura 3. Inibidores de *checkpoint* imunológico direcionados à via PD-1/PD-L1/2. A inibição da ativação dos linfócitos T via PD-1 pode ser revertida com anticorpos anti-PD1 e/ou anti os ligantes PD-L1/2. **A)** A ligação do PD-1 com seus ligantes PD-L1/PD-L2 presentes em células apresentadoras de antígeno ou células tumorais causa supressão da ativação dos linfócitos T via inibição de sinais envolvendo o reconhecimento de antígenos pelo TCR e ligação de moléculas co-estimuladoras (CD28, B7). **B)** O tratamento com anticorpos anti-PD-1 ou anti-PD-L1/2 bloqueia esse mecanismo de inibição favorecendo a atividade antitumoral dos linfócitos T. PD-1 receptor 1 de morte celular programada; PD-L1: ligante 1 do receptor de morte celular programada; PD-L2: ligante 2 do receptor de morte celular programada TCR = receptor da célula T. **Fonte:** Teixeira *et al.*, 2019.

Apesar dos avanços no tratamento, muitos pacientes apresentam resistência intrínseca ou desenvolvem rapidamente resistência aos inibidores da via MAPK e ao bloqueio do *checkpoint* imunológico. A ausência de resposta pode resultar tanto de mutações e eventos não mutacionais nas células tumorais quanto de alterações no microambiente tumoral. Mecanismos de resistência comuns permitem que as células tumorais contornem a dependência das mutações iniciais da via MAPK e escapem do sistema imunológico, favorecendo a progressão do melanoma (Winder; Virós, 2017). A resistência aos inibidores de BRAF ocorre principalmente por reativação da via MAPK, incluindo dimerização de RAF, mutações em RAS, NF1 e RTKs, além de *splicing* aberrante de BRAF. Mutações em MEK1, superexpressão de COT e ativação da via PI3K/AKT/mTOR também contribuem para a resistência. Estudos mostram que pacientes com progressão da doença após resposta inicial apresentam maior agressividade tumoral e metástases em novos locais, refletindo a heterogeneidade tumoral e mecanismos diversos de resistência. Essas descobertas justificam o desenvolvimento de terapias combinadas para superar a resistência adquirida (Winder; Virós, 2017). Tumores com baixa carga mutacional são menos reconhecidos pelo sistema imune, e a perda de mutações ao longo da evolução tumoral reduz a resposta imune. Além disso, mutações na via JAK/STAT1 do interferon- γ , expressão de PD-L1 e ativação de vias como WNT/ β -catenina e PI3K/AKT/mTOR contribuem para a evasão imunológica. A presença de linfócitos T no tumor é essencial para a eficácia da imunoterapia, e a ativação da via WNT/ β -catenina pode impedir a infiltração dessas células. A resposta inflamatória

pode induzir a desdiferenciação tumoral, dificultando o reconhecimento pelas células T, enquanto a seleção de clones menos imunogênicos favorece a progressão do câncer (Winder; Virós, 2017). Embora as terapias anti-PD-1 e anti-CTLA-4 apresentem efeitos antitumorais duradouros, suas taxas de resposta ainda são baixas, possivelmente devido à resistência intrínseca e adquirida aos tratamentos (Olbryt; Rajczykowski; Widlak, 2020). Dois pontos de verificação imunológicos amplamente estudados, TIM-3 (imunoglobulina de células T e domínio 3 da mucina) e TIGIT (imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM), desempenham um papel fundamental na resistência do melanoma às imunoterapias atuais, especialmente aos tratamentos voltados para a via PD-1/PD-L1/2 (Machiraju *et al.*, 2021). Os complexos I e II do antígeno leucocitário humano (HLA) desempenham um papel essencial na apresentação de antígenos, sendo fundamentais para a função dos linfócitos. No melanoma, o comprometimento da função do HLA é amplamente documentado e contribui para a redução da eficácia das terapias anti-PD-1 e anti-CTLA-4, atualmente consideradas terapias de primeira linha para os tumores sem mutação em BRAF (Thornton *et al.*, 2022).

2.1.3 Principais modelos experimentais murinos para o estudo do melanoma

Apesar dos avanços significativos proporcionados pelos estudos *in vitro*, a complexidade dos processos biológicos muitas vezes requer investigação *in vivo*. Por isso, a necessidade de modelos experimentais tem se tornado cada vez maior, permitindo uma compreensão mais detalhada das doenças humanas sem comprometer a segurança dos indivíduos (Becker *et al.*, 2010). Diversos modelos de melanoma em camundongos foram desenvolvidos e são amplamente utilizados para: (i) investigar a função de proteínas específicas na progressão do melanoma; (ii) reproduzir determinados aspectos biológicos dos melanomas humanos; e (iii) avaliar de forma criteriosa novos fármacos e terapias (Becker *et al.*, 2010).

2.1.3.1 Modelos de transplante de xenoenxerto

Nos modelos de transplante singênico, células de melanoma originadas de uma linhagem específica de camundongo são isoladas e posteriormente transplantadas para indivíduos da mesma linhagem (Kuzu et al., 2015). Como as células tumorais e o hospedeiro compartilham o mesmo background genético, as células transplantadas não sofrem rejeição pelo sistema imunológico do receptor. Dessa forma, a principal vantagem dos modelos de transplante singênico é a preservação de um sistema imunológico funcional, permitindo uma representação mais fiel do microambiente tumoral em comparação com os modelos de xenoenxerto (Mckinney; Holmen, 2011). Por esse motivo, esses modelos são fundamentais para avaliar a eficácia de imunoterapias, como citocinas, anticorpos imunomoduladores e vacinas. Além disso, são uma ferramenta valiosa para investigar as interações entre as células do melanoma e o sistema imunológico, incluindo linfócitos T e B e células dendríticas (Kuzu et al., 2015). Embora existam diferentes modelos singênicos, como o melanoma de Harding-Passey em camundongos ICR e o melanoma S91 em camundongos DBA, o melanoma B16 em camundongos C57BL/6 é o mais comumente utilizado (Kuzu et al., 2015).

O modelo de camundongo xenoenxertado foi desenvolvido para investigar a metástase. Nesse modelo, células de melanoma humano são cultivadas e implantadas por via subcutânea na pele ou em órgãos de camundongos imunocomprometidos (Kuzu et al., 2015). Esses camundongos imunocomprometidos pertencem a linhagens geneticamente modificadas com mutação no gene *Foxn1*, essencial para o desenvolvimento do timo, resultando em deficiência na função das células T, ou podem ser portadores de imunodeficiência combinada grave, uma condição caracterizada por deficiências imunológicas tanto em células B quanto em células T (Kuzu et al., 2015). A principal vantagem do modelo de xenoenxerto é a utilização de células de melanoma derivadas de humanos, proporcionando uma reprodução mais fiel da complexa heterogeneidade

genética do câncer. Além disso, são de fácil desenvolvimento e obtenção de resultados em um curto período, geralmente em poucas semanas (Richmond; Su, 2008). No entanto, a maioria das linhagens celulares de melanoma são desenvolvidas em condições não fisiológicas, e não em seu tecido de origem, o que compromete sua representatividade em relação ao tumor original. Consequentemente, os modelos de xenoenxerto apresentam limitações na reprodução fiel do microambiente tumoral, pois não possuem um sistema imunológico funcional (Sanmamed et al., 2016).

2.1.3.2 Modelos de transplante singênico

A linhagem de células B16-F10 foi desenvolvida a partir da linhagem de células B16, que originalmente foi isolada de um tumor espontâneo em um camundongo C57BL/6 em 1954 no Jackson Laboratories, Estados Unidos. Para criar a sublinhagem B16-F10, as células B16 foram injetadas em camundongos da mesma linhagem, e os tumores secundários resultantes foram coletados, cultivados e reinjetados em novos camundongos. Este processo foi repetido várias vezes para selecionar células com alta capacidade metastática, especialmente para formar colônias metastáticas nos pulmões. Após dez ciclos de seleção, as células B16-F10 foram estabelecidas como uma sublinhagem altamente metastática, ideal para estudos de metástase e formação de tumores em modelos murinos (Poste et al., 1982).

Nos modelos de transplante singênico o rápido crescimento tumoral representa tanto uma vantagem quanto uma limitação, pois os camundongos geralmente precisam ser eutanasiados em poucas semanas devido ao grande volume tumoral (Kuzu et al., 2015). Consequentemente, os modelos singênicos não reproduzem o ambiente inflamatório crônico característico do melanoma humano (Sanmamed et al., 2016). Outra possível limitação está nas diferenças dos imunofenótipos das linhagens de células tumorais transplantáveis. Por exemplo,

camundongos C57BL/6 tendem a apresentar respostas imunes do tipo Th1, enquanto camundongos BALB/c são mais predispostos a respostas Th2. No entanto, apesar dessas variações, os modelos singênicos continuam sendo ferramentas valiosas para investigar as respostas imunes ao melanoma e para a identificação de novas imunoterapias (Becker et al., 2010).

2.1.3.3 Modelos geneticamente modificados

O avanço no desenvolvimento de modelos de camundongos geneticamente modificados tem sido fundamental para expandir o entendimento sobre a patogênese molecular do melanoma. Esses modelos têm contribuído significativamente para a identificação de novos genes, vias moleculares e potenciais alvos terapêuticos. Entre eles, destacam-se os camundongos transgênicos, que apresentam mutação ou superexpressão de genes específicos, e os camundongos *knockout*, nos quais determinadas regiões do genoma são seletivamente eliminadas (Lee, 2014). Os modelos geneticamente modificados apresentam diversas vantagens, pois possibilitam a investigação de diversas abordagens terapêuticas em diferentes estágios do melanoma, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no tratamento da doença (Richmond; Su, 2008). No entanto, apresentam algumas limitações. Como os estudos geralmente focam em um ou dois genes específicos, esses modelos não reproduzem completamente as interações entre as células de melanoma e as células do microambiente tumoral. Em especial, nos modelos transgênicos, isso se dá pelas células de melanoma não apresentarem as múltiplas anormalidades genéticas que influenciam sua iniciação, progressão e capacidade metastática (Richmond; Su, 2008). Além de serem tecnicamente complexos, os modelos geneticamente modificados demandam um alto investimento financeiro, além de exigirem um longo período para sua implementação (Kuzu et al., 2015). Neste estudo, foram

empregados tanto o modelo de transplante singênico quanto o modelo geneticamente modificado, utilizando-se animais *knockout*.

2.2 Resposta imune antitumoral

A interação dinâmica entre o sistema imunológico e o desenvolvimento do câncer tem sido amplamente investigada nas últimas décadas, revelando a complexidade do papel do sistema imune na modulação do crescimento tumoral e na resposta antitumoral. O microambiente tumoral desempenha uma função crucial na regulação das respostas imunes ao longo da progressão da doença (Grivennikov; Greten; Karin, 2010; Kim; Emi; Tanabe, 2007). Uma resposta antitumoral eficaz e bem-sucedida depende de uma série de eventos coordenados, começando com o *priming* adequado das células T contra antígenos específicos do tumor, que são processados e apresentados pelas células do sistema imune. Após a ativação inicial, as células T específicas devem migrar para o tecido tumoral, infiltrando o microambiente tumoral, onde suas funções citotóxicas são ativadas para destruir as células cancerígenas. Isso inclui a eliminação eficaz das células tumorais destruídas e o restabelecimento da arquitetura tecidual e homeostase. No entanto, a disfunção em qualquer uma dessas etapas pode comprometer a eficácia da resposta antitumoral e contribuir para a progressão da doença (Egen; Ouyang; Wu, 2020). Essas etapas são possíveis graças à interação coordenada entre células imunes inatas, como macrófagos, células dendríticas (DCs), células NK, neutrófilos, e células imunes adaptativas, como linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Egen; Ouyang; Wu, 2020). As células NK, em especial, desempenham papel essencial na detecção precoce e eliminação de células tumorais com baixa expressão de MHC-I, além de secretarem citocinas como o IFN- γ (Morvan; Lanier, 2016). O sucesso ou fracasso dessas interações está intimamente ligado ao conjunto robusto de antígenos específicos presentes no tumor e à capacidade do sistema imunológico de reconhecê-los de maneira eficiente (Egen; Ouyang; Wu, 2020).

2.2.1 Imunoedição do câncer

A primeira fase da imunoedição do câncer é a eliminação, um processo de proteção imunológica que impede o desenvolvimento ou crescimento do tumor. Se esse processo for incompleto, ele pode passar para a segunda fase, chamada equilíbrio, onde células cancerígenas mutadas ainda persistem no organismo. Essa fase pode ser comparada à dormência tumoral e representa uma transição para a terceira fase, a de escape. Nessa fase, as células cancerígenas desenvolvem formas de evitar a resposta imunológica, permitindo a progressão tumoral (Dunn; Koebel; Schreiber, 2006).

Os antígenos das células tumorais são capturados pelas DCs para processamento, que precisam receber sinais imunogênicos para evitar a tolerância ao tumor e estimular posteriormente a resposta imune adaptativa. Em seguida, as DCs apresentam os antígenos aos linfócitos T CD8+, ativando a resposta contra o câncer, sendo crucial o equilíbrio entre linfócitos T CD8+ efetores e reguladores (Tregs) para o sucesso dessa resposta. As células efetoras T CD8+ então migram e se infiltram no tumor, onde reconhecem e matam as células cancerígenas. A morte dessas células induz a liberação de novos antígenos, ampliando a resposta imunológica. No entanto, esse ciclo pode ser interrompido, pois o tumor pode evitar a detecção dos antígenos, induzir respostas imunológicas inadequadas ou suprimir a ação dos linfócitos T efetores (Motz; Coukos, 2013; Chen; Mellman, 2013).

Os tumores têm a capacidade de suprimir a imunidade tanto de maneira sistêmica quanto no microambiente tumoral, interferindo nas respostas imunes e impedindo a eliminação eficaz das células cancerígenas (Rabinovich; Gabrilovich; Sotomayor, 2007). O microambiente tumoral pode ser dominado por células Tregs, que suprimem as células T efetoras antitumorais T CD8+ e NK, através da produção de citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10 (Zou, 2006). Os tumores em modelos murinos que produzem TGF- β podem induzir a conversão de células T efetoras antitumorais em células Tregs, permitindo que o tumor escape da

destruição pelas células do sistema imunológico (Liu *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2007). A visão geral da resposta imunológica contra o tumor no contexto das células efetoras antitumorais T CD8⁺ está representada na Figura 4.

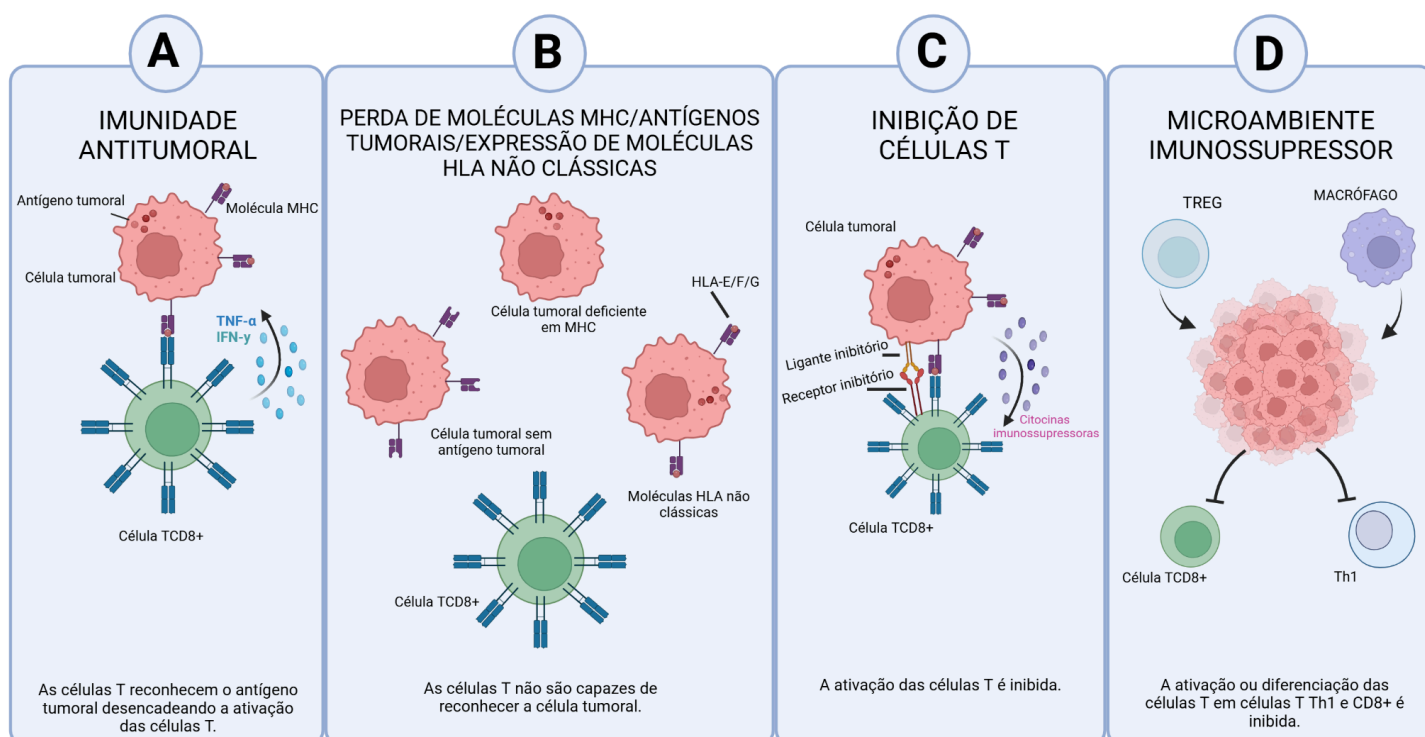


Figura 4. Processos Reguladores Imunes do Microambiente Tumoral. Visão geral da resposta imunológica contra o tumor *versus* mecanismos de evasão imunológica pelos tumores no contexto das células T CD8⁺. **A)** As células T CD8⁺ são as células imunes preferenciais no papel de imunidade contra o câncer, devido à sua capacidade de destruir células tumorais malignas quando o receptor de células T (TCR) reconhece antígenos tumorais específicos apresentados na superfície das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I). **B)** Moléculas MHC I podem ser reguladas negativamente nas células tumorais, e as células T CD8⁺ não conseguem reconhecer as células tumorais. Além disso, a variante de perda de antígeno das células tumorais leva à falta de reconhecimento do tumor pelas células T CD8⁺. **C)** As respostas das células T são inibidas pela envolvimento de receptores inibitórios e seus respectivos ligantes. Citocinas imunossupressoras levam à supressão da resposta imunológica anti-tumoral. **D)** Células T reguladoras (Tregs) suprimem as respostas das células T efetoras contra os tumores. Células supressoras derivadas de células mieloides (MDCSs) se acumulam e suprimem as respostas das células T anti-tumorais. **Fonte:** Adaptado de Pansy *et al.*, 2021.

2.2.2 Principais células imunes envolvidas no câncer

O microambiente tumoral é uma rede complexa que inclui as células cancerígenas e seu estroma circundante, composto por células endoteliais, células mesenquimais e células imunes, que desempenham papéis fundamentais na progressão do tumor e na modulação da resposta imune. Entre as células imunes inatas, destacam-se os macrófagos, neutrófilos, mastócitos, DCs e células NK, e entre as células imunes adaptativas, os linfócitos T e B. A interação dinâmica entre essas células influencia de maneira significativa o crescimento tumoral e a resposta imunológica do organismo, impactando diretamente o desenvolvimento e a evolução da doença (De Visser; Eichten; Coussens, 2006). Essas células interagem entre si por meio de contato direto ou pela produção de citocinas e quimiocinas, atuando de maneira autócrina e parácrina para regular e moldar o crescimento tumoral. A expressão de diversos mediadores e moduladores imunológicos, juntamente com a abundância e o estado de ativação de diferentes tipos celulares no microambiente tumoral, determina a direção em que o equilíbrio é inclinado, influenciando se a inflamação favorecerá o crescimento do tumor ou se a resposta imunológica antitumoral será ativada (Smyth; Dunn; Schreiber, 2006; Lin; Karin, 2007).

As células imunes mais abundantes no microambiente tumoral são os macrófagos associados ao tumor (TAMs) e os linfócitos T (Condeelis; Pollard, 2006). Os macrófagos M1 e as DCs são fundamentais na apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T durante a resposta imune antitumoral, além de contribuírem para a produção de citocinas em tumores já estabelecidos (Grivennikov; Greten; Karin, 2010). As células T maduras são divididas em dois grupos principais: linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs) e linfócitos T auxiliares CD4⁺ (Th). As células Th são subdivididas em Th1, Th2, Th17 e células Tregs, além das células NKs. É importante destacar que os diferentes tipos de linfócitos podem apresentar efeitos tanto supressores quanto promotores sobre o tumor, dependendo da função que desempenham (Smyth; Dunn; Schreiber, 2006; Langowski; Kastelein; Oft, 2007;

Denardo *et al.*, 2009). O aumento no número de linfócitos T, particularmente CTLs e Th1 ativadas, está correlacionado com uma melhor sobrevida em diversos tipos de câncer, como câncer de cólon invasivo, melanoma, mieloma múltiplo e câncer de pâncreas. Da mesma forma, a deficiência de linfócitos T ou a interrupção de mecanismos citotóxicos específicos podem tornar os animais experimentais mais vulneráveis à carcinogênese, seja espontânea ou induzida quimicamente (Grivennikov; Greten; Karin, 2010).

Outras células imunes também influenciam a tumorigênese. Os neutrófilos, por exemplo, podem desempenhar tanto funções promotoras de tumores quanto tumorícidas, dependendo de seu estágio de diferenciação e da presença de TGF- β (Fridlender *et al.*, 2009).

2.2.3 Principais citocinas envolvidas

Citocinas são pequenas proteínas sinalizadoras liberadas por células, principalmente do sistema imunológico, que regulam e coordenam diversas funções biológicas, especialmente relacionadas à imunidade e inflamação. O microambiente tumoral é rico em citocinas derivadas principalmente de células imunológicas, quimiocinas e mediadores pró-angiogênicos, como o fator de necrose tumoral (TNF), o fator de crescimento transformador β (TGF- β), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e diversas interleucinas. Esses componentes desempenham papéis cruciais na regulação da inflamação, na promoção da angiogênese e na modulação da resposta imunológica dentro do tumor (De Visser; Eichten; Coussens, 2006).

Diversas citocinas podem tanto promover quanto inibir o desenvolvimento e a progressão tumoral, independentemente da sua origem (Lin; Karin, 2007). Através da ativação de diversos efetores, as citocinas modulam o ambiente imunológico e inflamatório, promovendo a imunidade antitumoral (como IL-12 e IFN γ) ou favorecendo a progressão tumoral (como IL-6, IL-17 e IL-23). Elas também exercem efeitos diretos no crescimento e na sobrevivência das células cancerígenas,

mediando interações com ligantes como TRAIL e FasL, presentes em células T CD8+, T CD4+, NK, macrófagos e células dendríticas (Grivennikov; Greten; Karin, 2010). Os TAMs são reconhecidos como um dos principais mediadores na interação entre inflamação e câncer, além de serem uma importante fonte de citocinas (Mantovani *et al.*, 2008). Os macrófagos podem ser polarizados e classificados em dois tipos principais: M1 e M2 (Sica; Allavena; Mantovani, 2008). No contexto tumoral, os macrófagos tipo M1, ativados por IFN γ , são marcados pela produção intensa de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23 e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOs) e ciclooxygenase 2 (COX-2). Esses macrófagos desempenham um papel fundamental na promoção da resposta imune antitumoral. Em contrapartida, os macrófagos tipo M2, ativados predominantemente por IL-4, IL-10 e IL-13, têm a capacidade de regular negativamente a expressão de MHC classe II e IL-12, além de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10. Outras moléculas relacionadas a esse fenótipo são a enzima arginase e a RELM- α em camundongos, codificada pelo gene Fizz 1. A maioria dos TAMs exibe um fenótipo M2, o que favorece a angiogênese tumoral, a remodelação do tecido (Siva; Allavena; Mantovani, 2008) e consequentemente, a progressão do tumor. A Figura 5 mostra as interações dos TAMs no microambiente tumoral.

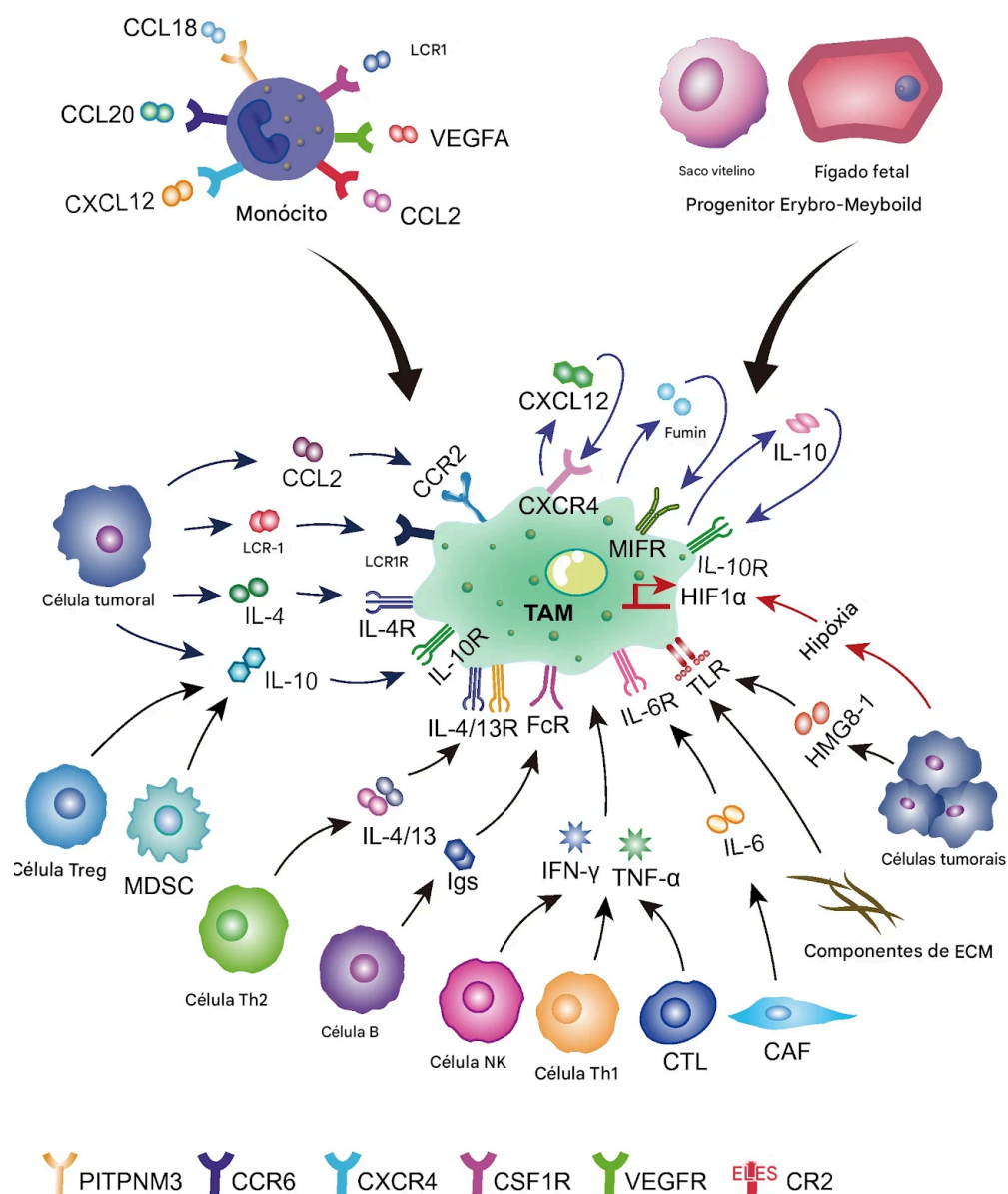


Figura 5. Origem dos TAMs e suas interações com o microambiente tumoral. Os macrófagos associados a tumores (TAMs) são originados principalmente de monócitos da medula óssea ou de células progenitoras mieloides-eritróides presentes no saco vitelino ou no fígado fetal. Os monócitos da medula óssea são recrutados e diferenciados em TAMs por quimiocinas e citocinas liberadas por células tumorais ou estromais no microambiente tumoral, como CCL2, CSF-1 e VEGFA. Os TAMs são estimulados por CCL2, IL-4 e IL-10 secretadas por células tumorais, além de imunoglobulinas (Igs), IL-10 e IL-4/13 liberadas por células imunes, como células B, células T reguladoras (Treg) e células T auxiliares (Th). Além disso, sua ativação pode ocorrer por meio de estímulos como hipóxia, HMGB-1 derivado do tumor e fatores autócrinos secretados pelos próprios TAMs, incluindo IL-10, MIF e CXCL12. AF: Célula associada ao fibroblasto do câncer, CCL2: Ligante 2 da quimiocina C-C, CCL18: Ligante 18 da quimiocina C-C, CCL20: Ligante 20 da quimiocina C-C, CCR2: Receptor 2 da

quimiocina C-C, CTL: Linfócito T citotóxico, CXCL12: Ligante 12 da quimiocina C-X-C, CXCR4: Receptor 4 da quimiocina C-X-C, ECM: Matriz extracelular, FCR: Receptor Fc, HIF1a: Fator induzido por hipóxia 1 alfa, HMG81: Proteína de grupo de alta mobilidade B1, IFN- γ : Interferon gama, Igs: Assinatura gênica inflamatória, IL10: Interleucina 10, IL10R: Receptor de interleucina 10, IL4: Interleucina 4, IL4R: Receptor de interleucina 4, IL413R: Receptor de interleucina 4/13, IL6: Interleucina 6, IL6R: Receptor de interleucina 6, LCR-1: Receptor tipo lectina 1, LCR1: Receptor tipo lectina 1, LCR1R: Receptor do LCR1, MDSC: Células supressoras mieloides derivadas, MIFR: Receptor do fator inibidor da migração de macrófagos, TAM: Macrófago associado ao tumor, TLR: Receptor do tipo Toll. **Fonte:** Adaptado de Zhu *et al.*, 2021.

O TNF- α é uma citocina multifuncional que desempenha papéis na apoptose, sobrevivência celular, inflamação e imunidade (Van Horssen, 2006), e é produzida principalmente por macrófagos M1, linfócitos T e células NK. A expressão em níveis mais baixos é observada em uma variedade de outras células, incluindo fibroblastos, células musculares lisas e células tumorais (Bemelmans; Van Tits; Buurman, 2017). A nível celular, o TNF- α exerce seus efeitos por meio de seus receptores, o TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) também conhecido como p55 ou CD120a e TNFR2 (Tumor Necrosis Factor Receptor 2), também conhecido como p75 ou CD120b. Como resultado, o TNF- α desempenha papéis complexos e ambíguos no câncer. Por um lado, sua ação anticancerígena é evidenciada pela indução da morte das células malignas, um mecanismo que pode ser aproveitado no desenvolvimento de terapias antitumorais. Por outro lado, o TNF- α pode promover a proliferação, sobrevivência, migração e angiogênese em células tumorais que se tornam resistentes à citotoxicidade induzida, favorecendo assim a progressão do câncer. Dessa forma, o TNF- α se configura como uma citocina ambivalente, com potencial tanto pró-tumorigênico quanto anti-tumorigênico, dependendo do contexto celular e tumoral (Wang; Lin, 2008).

Os interferons (IFNs) são amplamente reconhecidos por sua capacidade de inibir o crescimento das células de melanoma humano *in vitro*. Estudos mostraram que tanto os IFNs do tipo I (alfa e beta) quanto os do tipo II (gama) conseguem suprimir a proliferação dessas células (Garbe; Krasagakis, 1993). A produção de IFN- β decorre de uma via independente de MyD88, específica para os receptores

TLR3 e TLR4, enquanto a produção de interferon IFN- γ resulta de uma via de sinalização comum dependente de MyD88 (Yamamoto *et al.*, 2003).

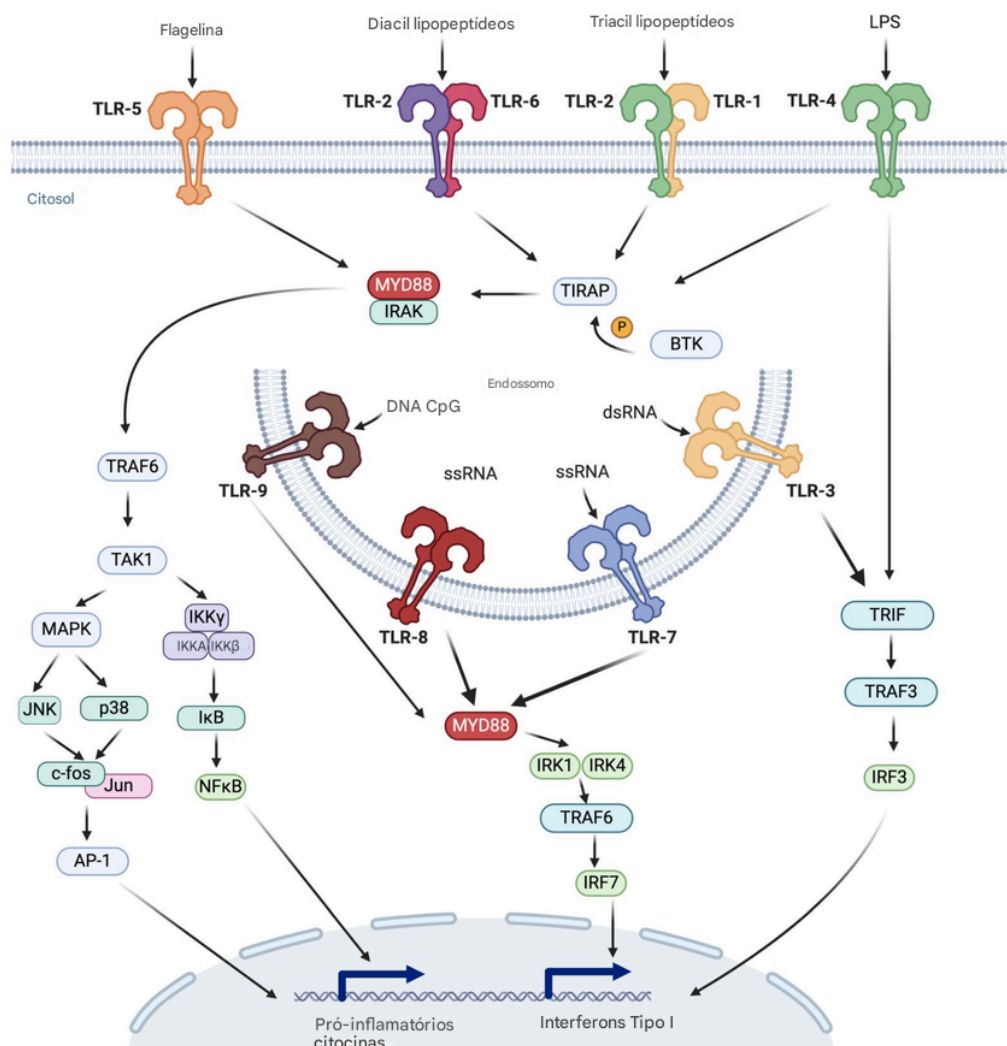


Figura 6. Visão geral das vias de sinalização do receptor Toll-like (TLR). Este diagrama representa os TLRs da superfície celular (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 e TLR-6) e seus ligantes (flagelina, diacil lipopeptídeos, triacil lipopeptídeos e LPS). Também mostra os TLRs endossômicos (TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9) reconhecendo moléculas de DNA e RNA CpG. O diagrama ilustra as cascatas de sinalização subsequentes envolvendo proteínas adaptadoras, como MYD88, TRIF e TRAF6, levando à ativação de NF- κ B e IRFs, resultando na expressão de citocinas pró-inflamatórias e interferons tipo I. Fonte: Chen; Wu; Wu, 2024.

Independentemente de sua origem, todos os IFNs podem atuar diretamente nas células tumorais, exercendo efeitos antitumorais, ou nas células imunes, mediando efeitos antitumorais indiretos (Jorganovic *et al.*, 2020) (Figura 7).

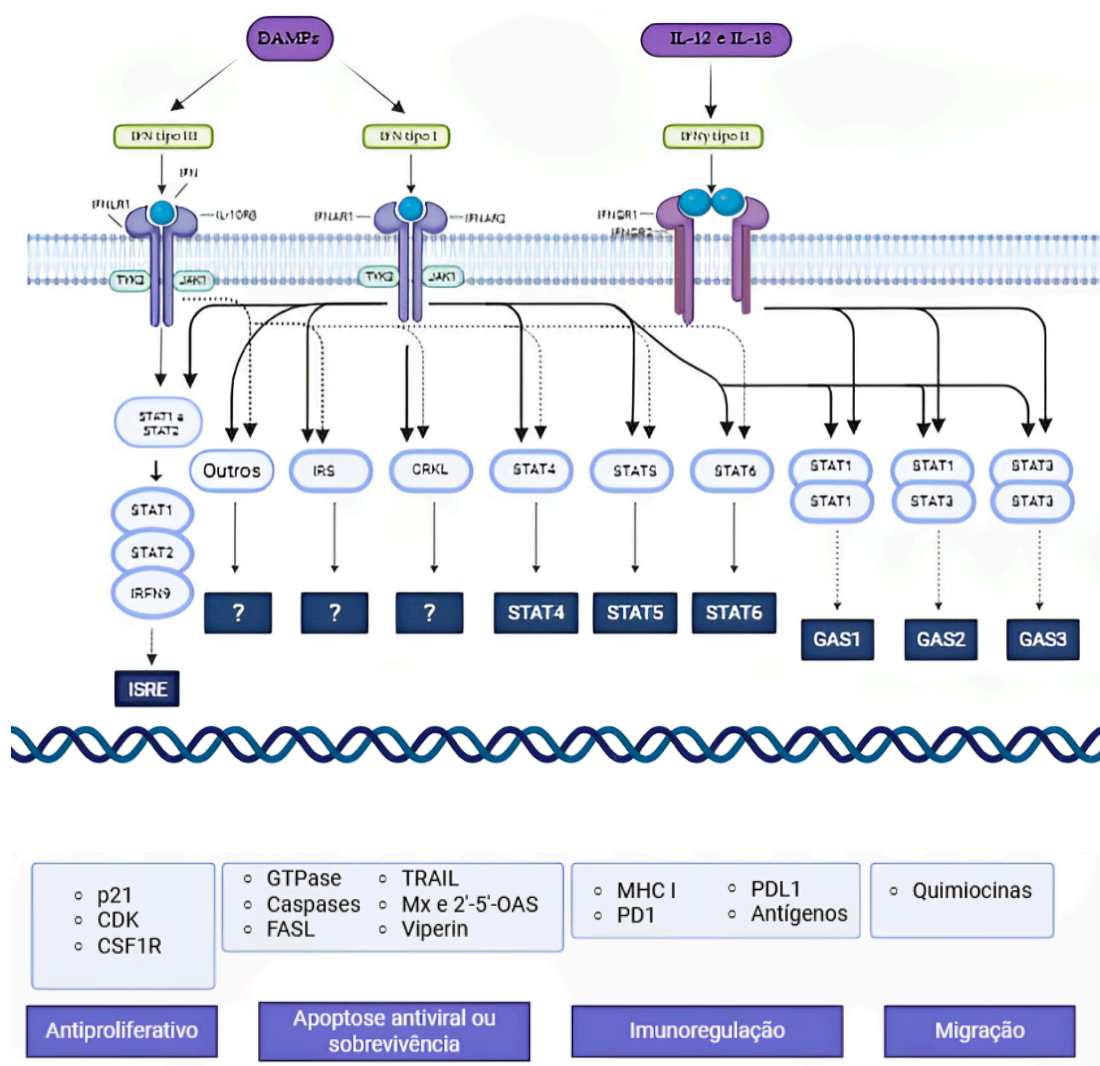


Figura 7. Vias de sinalização dos interferons que mediam respostas antitumorais. Os diferentes tipos de interferon (IFN) são produzidos em resposta a padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como no caso dos IFNs tipos I e III, ou a citocinas, como no caso do IFN tipo II. Cada IFN se liga ao seu receptor específico — IFNAR (IFN- α/β), IFNGR (IFN- γ) ou IFNLR (IFN- λ) — associados a quinases JAK (Janus quinases), que fosforilam os receptores e recrutam fatores de transdução e ativação da transcrição (STATs). Esses fatores formam complexos como o ISGF3 (com IRF9), que migram ao núcleo e se ligam a elementos reguladores como ISRE (elemento de resposta sensível ao IFN) e GAS (sequência ativada por gama). Os IFNs tipo I ativam todos os membros da família STAT e também vias não-STAT, como CRKL (CRK-like) e IRS (substrato do receptor de

insulina), enquanto os IFNs tipos I, II e III ativam STAT1 e STAT3. Até o momento, o IFN tipo III aciona apenas vias já ativadas pelo tipo I. Essas sinalizações regulam milhares de genes cujos produtos promovem efeitos antivirais, antiproliferativos, apoptóticos e imunorregulatórios, com genes como CDK (quinase dependente de ciclina), CSF1R (receptor do fator estimulador de colônias 1), Mx (proteína de ligação ao GTP induzida por IFN), 2'-5'-OAS (oligoadenilato sintetase), FASL (ligante FAS), TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), MHC I (complexo principal de histocompatibilidade classe I), PD1 (proteína de morte celular programada 1) e PDL1 (ligante de PD1), além da tirosina quinase TYK2. Esses conjuntos de genes regulados pelos IFNs (IRGs) constituem assinaturas moleculares que refletem as vias de sinalização ativadas e os tipos de resposta celular gerada. **Fonte:** Adaptado de Parker; Rautela; Hertzog, 2016.

Os IFNs tipo I desempenham um papel crucial na imunidade antitumoral, promovendo uma resposta imunológica extrínseca ao estimular populações de linfócitos citotóxicos, células NK, células dendríticas e células linfóides inatas (ILCs). Além disso, eles regulam negativamente as células supressoras, como as MDSCs e as células Tregs, que inibem a imunidade antitumoral. No aspecto intrínseco, os IFNs tipo I afetam as células tumorais, inibindo a proliferação e modulando processos como apoptose, diferenciação, migração e expressão de antígenos de superfície celular. Esses IFNs podem ser produzidos pelas células tumorais, mas principalmente pelas células imunes, ativando a resposta imune de forma complementar aos efeitos nas células tumorais, como apresentação de antígenos, produção de citocinas e vias de sinalização de morte celular. Portanto, o efeito antitumoral dos IFNs tipo I depende da interação entre as células imunes e tumorais, sendo um fator essencial para o sucesso da resposta (Parker; Rautela; Hertzog, 2016).

O IFN tipo II (IFN- γ) também exerce um papel essencial na ativação da imunidade celular, sendo fundamental para estimular a resposta imune contra o tumor. Devido às suas funções citostáticas, pró-apoptóticas e antiproliferativas, o IFN- γ é considerado uma ferramenta promissora para a imunoterapia adjuvante em diversos tipos de câncer. Além disso, o IFN- γ pode inibir a angiogênese no tumor, induzir a apoptose regulada de linfócitos T e estimular a atividade de macrófagos M1 pró-inflamatórios, ajudando a combater a progressão do tumor (Jorganovic *et al.*, 2020). A produção inicial de IFN- γ é realizada principalmente por células NK e NKT.

Já durante a resposta adaptativa, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ tornam-se as principais fontes dessa citocina (Burke; Young, 2019). Alguns dos mecanismos antitumorais do IFN- γ envolvem a indução da parada do ciclo celular, apoptose e necroptose. Em diversos tipos de câncer, como câncer de mama, câncer colorretal e câncer hepatocelular, o IFN- γ inibe o crescimento das células tumorais, aumentando a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, como p27Kip, p16 e p21. Em melanoma, o IFN- γ aumenta a expressão de miR-29a/b, que está associado à diminuição da proliferação celular, sem envolver as proteínas reguladoras do ciclo celular. Este miR reduz a expressão da quinase CDK6, interrompendo o ciclo celular e exercendo seu efeito antimelanoma (Jorganovic *et al.*, 2020).

A IL-6 é produzida e secretada por diversos tipos de células, incluindo as tumorais, e desempenha um papel importante na proliferação e diferenciação das células malignas. Ela é frequentemente encontrada em níveis elevados tanto no soro quanto nos tecidos tumorais em indivíduos com diferentes tipos de câncer. A elevação dos níveis de IL-6 está associada a um crescimento tumoral mais agressivo e à baixa resposta das terapias. Pacientes com níveis elevados de IL-6 circulante geralmente apresentam um pior prognóstico e sobrevida global mais curta, enquanto níveis mais baixos de IL-6 estão relacionados a uma melhor resposta ao tratamento quimio e imunoterápico (Kumari *et al.*, 2016).

As células NK desempenham um papel essencial como efetores da imunidade inata, sendo responsáveis pela primeira linha de defesa contra o crescimento tumoral. Recentemente, a IL-4 tem sido identificada como um regulador de função dessas células, embora seu papel específico na modulação da resposta imunológica em pacientes com câncer ainda não esteja completamente esclarecido (Vuletíc *et al.*, 2020). A IL-4 é uma citocina predominantemente derivada de células Th2, e compartilha diversas características estruturais e funcionais com outras citocinas. Identificada inicialmente na década de 1980 como um fator de crescimento para células B, a IL-4 exerce uma ampla gama de efeitos em diversos tipos celulares, como linfócitos T e B, monócitos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, astrócitos e osteoblastos (Kawakami; Puri, 2007). Além disso, a IL-4 é capaz de mediar diretamente e indiretamente os efeitos antitumorais, tanto *in vitro*

quanto *in vivo*. Ela apresenta atividade antiproliferativa contra diversas linhagens celulares de tumores sólidos, como câncer gástrico, carcinoma de células renais, câncer de pulmão, melanoma e câncer de mama. Estudos mostraram que a IL-4 aumenta a expressão da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e potencializa os efeitos antitumorais de TNF α e IFN- γ (Kawakami; Puri, 2007).

A IL-2 é uma citocina essencial com efeitos pleiotrópicos no sistema imunológico. Sua descoberta em 1976 marcou um avanço significativo na pesquisa básica em imunologia, além de abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de imunoterapias no tratamento de cânceres humanos. Sendo uma das primeiras citocinas a ser considerada para imunoterapia contra o câncer, a IL-2 foi aprovada pelo FDA para o tratamento de carcinoma metastático de células renais em 1992 e, posteriormente, para melanoma metastático em 1998. Ela é produzida principalmente por linfócitos T CD4 ativadas por antígenos, mas também pode ser secretada por linfócitos T CD8, células NK e DCs ativadas (Jiang; Zhou; Ren, 2016). A IL-2 é um fator essencial para a manutenção das células TCD4 e desempenha um papel crucial na diferenciação dessas células. Ela pode estimular a atividade citotóxica de células TCD8 $^{+}$ e células NK, além de modular os programas de diferenciação das linfócitos T em resposta a antígenos. IL-2 promove a diferenciação de células T CD4 *naïve* em células Th1 e Th2, ao mesmo tempo em que inibe a diferenciação de células Th17, que possuem papel imunossupressor (Paul; Zhu, 2010; Szabo *et al.*, 2010).

As citocinas da família IL-12 são amplamente reconhecidas por seu papel fundamental na regulação das respostas imunes, tanto inatas quanto adaptativas (Mirlekar; Pylayeva-Gupta, 2021). Embora as citocinas da família IL-12 sejam predominantemente secretadas por células imunes inatas, elas também podem ser liberadas por células imunes adaptativas, dependendo da doença e do ambiente imunológico (Vignali; Kuchroo, 2012; Ma; Trinchieri, 2001). A IL-12, produzida por células apresentadoras de antígenos, como DCs e macrófagos M1, é essencial para o recrutamento e as funções efetoras das células T CD8 $^{+}$ e células NK, destacando-se como um dos principais fatores responsáveis pela indução de

respostas imunes antitumorais eficazes (Tugues *et al.*, 2014; Zundler; Neurath, 2015).

A IL-10 tem sido amplamente estudada devido aos seus múltiplos efeitos biológicos, que podem, em algumas situações, parecer contraditórios. Sua ação final varia significativamente conforme o contexto experimental e os tipos de células analisados (Mannino *et al.*, 2015). Diversos tipos de células são capazes de produzir IL-10, incluindo monócitos/macrófagos, DCs, células B, diferentes subconjuntos de células Tregs, além de células T CD4⁺ e CD8⁺ e células NK (Maynard; Weaver, 2008; Hedrich; Bream, 2010). O papel da IL-10 na patogênese e progressão tumoral permanece altamente controverso. Enquanto alguns estudos sugerem que a IL-10 favorece o crescimento e a progressão do tumor, outras pesquisas apontam para sua atuação na supressão da angiogênese e metástase, contribuindo assim para a erradicação tumoral e a melhoria da sobrevida a longo prazo dos pacientes. Devido à sua reconhecida função como citocina imunossupressora, a IL-10 é frequentemente associada à promoção do escape imunológico tumoral, uma vez que pode reduzir a resposta imune antitumoral (Mannino *et al.*, 2015). Estudos indicam que concentrações elevadas da IL-10 são observadas em pacientes com melanoma nos estágios II e IV, estando associadas à modulação negativa das respostas imunológicas antitumorais. De forma complementar, níveis aumentados de IL-6 têm sido correlacionados a uma resposta imune ineficaz e a piores desfechos clínicos, além de desempenharem um papel relevante no desenvolvimento e na progressão do melanoma em estágios iniciais (Wang *et al.*, 2021).

As principais células e citocinas envolvidas na resposta imune antitumoral estão ilustradas na Figura 8.

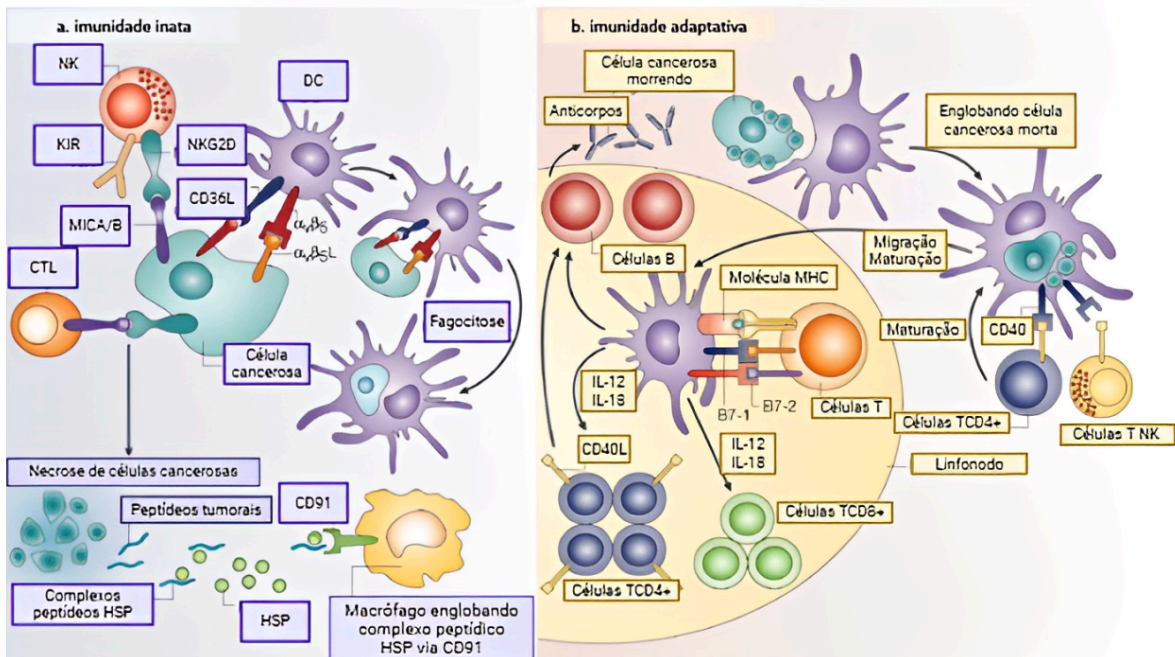


Figura 8. Vias direta e indireta de reconhecimento do câncer. A) As células do sistema imune inato reconhecem o câncer por meio de receptores de reconhecimento de padrões codificados na linha germinativa e outras moléculas de superfície celular. Células tumorais expressam diversos genes induzidos por estresse, como MICA e MICB, que ativam receptores NKG2D em células natural killer (NK), macrófagos e alguns linfócitos T citotóxicos (CTLs). As células NK também utilizam uma combinação de receptores inibitórios e ativadores, como os receptores do tipo imunoglobulina das células killer (KIRs), para detectar a perda de expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I nas células tumorais. Células dendríticas (DCs) fagocitam tumores apoptóticos por meio de CD36 e $\alpha\beta 5$. Macrófagos e DCs também utilizam receptores depuradores e CD91 para ingerir proteínas de choque térmico (HSPs) complexadas com peptídeos derivados de tumores, que são liberados por células cancerígenas necróticas. **B)** As células do sistema imune adaptativo são inicialmente estimuladas a reconhecer células cancerígenas por meio de “cross-priming” feito pelas DCs. Como as células tumorais não expressam moléculas coestimulatórias importantes para a ativação de linfócitos T, elas geralmente não conseguem induzir respostas celulares de forma eficiente. Em vez disso, as DCs capturam células tumorais mortas ou fragmentos de células, migram para linfonodos regionais e processam o material derivado do tumor nas moléculas CD1D (para apresentação às células NKT, não mostradas na figura), e nas moléculas MHC classe I e II, para apresentação aos linfócitos T CD4+ e CD8+. DCs maduras expressam moléculas coestimulatórias como B7-1 e B7-2 para potencializar a ativação dos linfócitos T. As DCs secretam IL-12 e IL-18 para promover respostas do tipo T helper 1 (TH1) em linfócitos T CD4+ e a ativação de linfócitos T CD8+ citotóxicos. Linfócitos T CD4+ ativados e células NKT expressam a molécula CD40 ligante, que estimula ainda mais a maturação das DCs por meio do sinal de CD40.

Linfócitos T CD4+ e DCs também ajudam a ativar linfócitos B para produzir anticorpos reativos contra proteínas tumorais. **Fonte:** Adaptado de Dranoff, 2004.

2.3 (1→3)(1→6)-β-D-glucanas

As (1→3)(1→6)-β-D-glucanas são um grupo diversificado de polissacarídeos compostos por monômeros de glicose unidos por ligações β-glicosídicas, e são amplamente encontradas em fungos (incluindo cogumelos, líquens e leveduras), algumas bactérias, algas marinhas e alguns cereais, como aveia e cevada (Du et al., 2019). Os efeitos terapêuticos desses polissacarídeos podem ser imunomoduladores ou metabólicos. Os efeitos metabólicos geralmente são observados em (1→3)(1→6)-β-D-glucanas derivadas de cereais, e incluem a modulação do microbioma e da microbiota intestinal, a melhora do metabolismo lipídico e glicêmico, além da redução dos níveis de colesterol (Du et al., 2019). Já os efeitos imunomoduladores são frequentemente associados às (1→3)(1→6)-β-D-glucanas derivadas de fungos, influenciando positivamente na resposta antitumoral, a cicatrização de feridas e demais condições relacionadas ao sistema imunológico (Castro; Calder; Roche, 2021).

Estruturalmente, esses polissacarídeos são formados por unidades de glicose conectadas por ligações glicosídicas β-(1→3) e/ou β-(1→4), sendo que as macromoléculas com cadeia linear exclusivamente β-(1→3) podem ter ramificações com ligações β-(1→6) com frequência variável (Edo et al., 2024). (1→3)(1→6)-β-D-glucanas provenientes de cereais são lineares, e as ligações glicosídicas são do tipo β-(1→3)(1→4), enquanto as provenientes de bactérias, que também são lineares, possuem apenas ligações β-(1→3). Já organismos que fazem parte do Reino Fungi, como fungos, cogumelos, líquens (associação simbiótica entre fungos e algas ou cianobactérias) e leveduras possuem cadeia linear com ligações β-(1→3) e ramificações β-(1→6) ao longo de sua estrutura. Ainda, as ramificações podem ser de uma única molécula de glicose (fungos, cogumelos e líquens) ou várias moléculas unidas por ligações β-(1→3) (leveduras) (Boutros; Magee; Cox,

2022). A estrutura química de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas de diferentes fontes está representada na Figura 9.

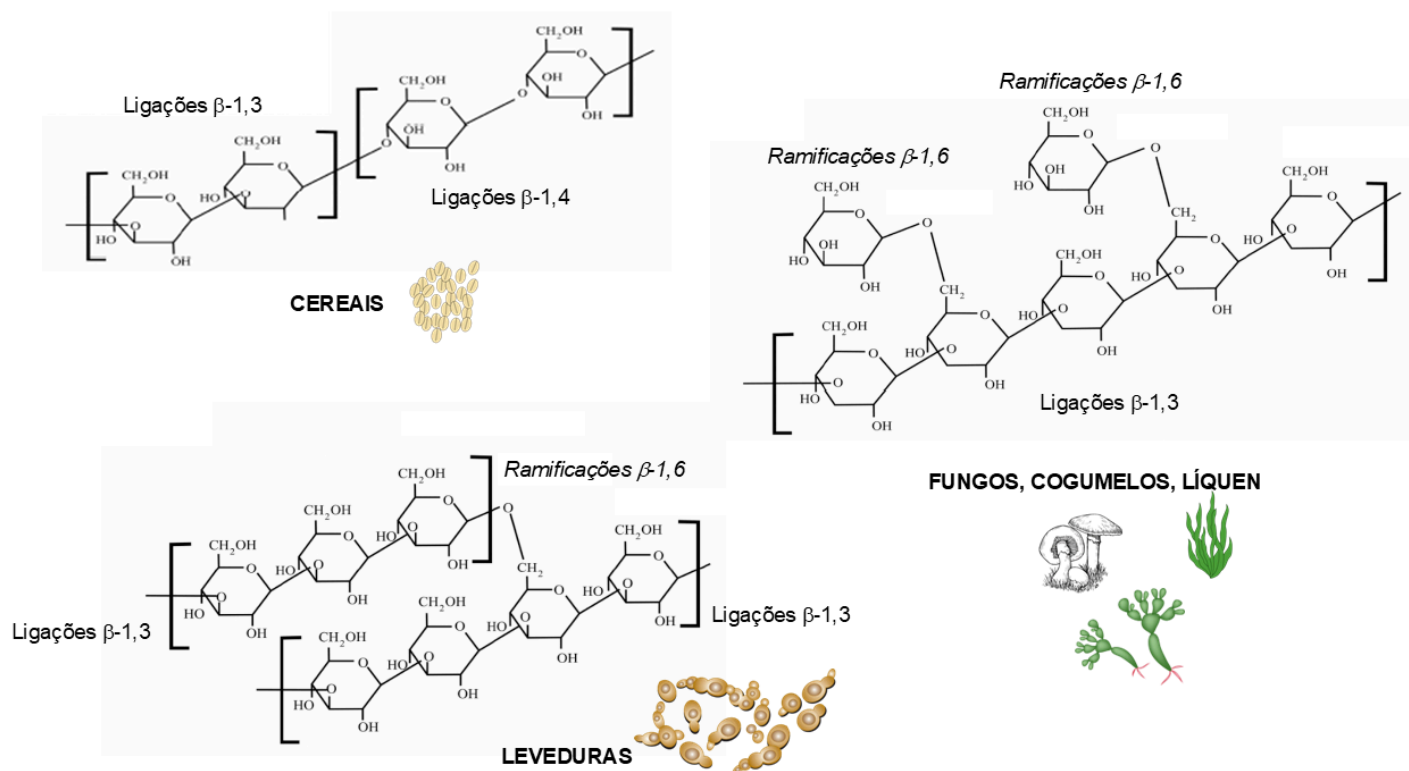


Figura 9. Estrutura química de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas de interesse médico obtidas de diferentes fontes. (1→3)(1→6)-β-D-glucanas provenientes de cereais são lineares, com ligações do tipo (1→3)(1→4)-β. Fungos, cogumelos e líquens possuem cadeia linear com ligações β-1;3 e ramificações β-1;6 com geralmente uma única molécula de glicose, enquanto que na cadeia linear β-1;3 de leveduras as ramificações β-1;6 podem ter mais de duas moléculas de glicose unidas por ligações β-1;3.

2.3.1 Imunomodulação por (1→3)(1→6)-β-D-glucanas

A imunomodulação pelas (1→3)(1→6)-β-D-glucanas é dependente das ligações β-1,3. Os mecanismos envolvidos não são completamente elucidados, e

variam de acordo com a seu peso molecular, grau de ramificação, solubilidade e conformação espacial em solução (Soltanian *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2020), sendo a conformação em tripla hélice importante para um maior efeito em células do sistema imunológico (De Marco Castro *et al.*, 2020; Wakshull *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2015). A Tabela 2 mostra a relação entre a estrutura química de diferentes (1→3)(1→6)-β-D-glucanas e seu efeito imunomodulador *in vivo*.

O efeito imunomodulador das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas ocorre principalmente por dois mecanismos. O primeiro envolve a promoção do crescimento de microrganismos intestinais, modulando a microbiota intestinal e, assim, potencializando a imunidade contra patógenos exógenos por meio de mecanismos não imunológicos (Shalini; Yengkhom; Subramani; Michael, 2019), e o outro é através da melhora da capacidade de fagocitose das células imunes inatas, aumentando também a atividade da imunidade humoral e a ativação de linfócitos (Kuo; Chang; Cheng; Wu, 2000).

Tabela 2. Estrutura química de diferentes (1→3)(1→6)-β-D-glucanas e seu efeito imunomodulador geral *in vivo*.

Fonte	Estrutura	P.M / Conformação	<i>In vivo / In vitro</i>	Atividade
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Cadeia principal de (1-3)-β-D-glucana com cadeias laterais ligadas em (1-6)-β	- / -	Ratos/células das placas de Peyer (PP)	↑ na produção de IL-5, IL-6 e IgA, redução nas concentrações de hemoglobina e hematócrito
<i>Agaricusbisporus</i> , <i>Agaricusbrasilensis</i>	(1-6)-β-D-Glucana	29 kDa e 45 kDa / -	Macrófagos humanos THP-1	↑ na expressão gênica de IL-1β, TNF-α e controle pró-inflamatório
<i>Antrodiacamphorate</i>	Cadeia principal de dextrana (1-3)-β-D com ramificações laterais de dextrana (1-6)-β	10–103 kDa/ Helicoidal	Células leucêmicas humanas U937 / Camundongos portadores de sarcoma 180	↓ na proliferação das células cancerígenas; atividade de células NK
<i>Pleurotusostreatus</i>	(1-3)-β-D-glucana, heteroglucanas	2200–2900kDa/ -	Linfócito	↑ na proliferação de linfócitos
Sintetizada quimicamente	Oligo-(1-3)-β-D-glucana-manose	0,83-0,99 kDa/Não helicoidal	Camundongos BALB/c	↑ do influxo de macrófagos (MO) na cavidade peritoneal, atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais; diminuição na porcentagem de linfócitos intra-peritoneais

-/-:

<i>Dictyophora indusiata</i>	Cadeia principal de (1-3)- β -D-glucana com cadeias laterais ligadas por (1-6)- β	480 kDa/ Tripla hélice	Camundongos Kunming (KM) inoculados com células S180	$\uparrow$ nos índices do timo e baço; $\uparrow$ IL-2, IL-6 e TNF- α no soro
<i>Flammulina velutipes</i>	(1-3)- β -D-glucana	200 kDa/Hélice simples	Célula tumoral de sarcoma 180	$\uparrow$ na expressão de citocinas
<i>Sclerotium rolfsii</i>	(1-3)- β -D-glucana substituído por resíduos únicos de (1-6)-D-Glc	1100kDa/Tripla hélice	Monócitos humanos	$\uparrow$ de TNF- α nos monócitos
<i>Schizophyllum commune</i>	Cadeia principal de (1-3)- β -D-glucana com ramificação de (1-6)- β -D-glucopiranosose a cada três repetições	102-104 kDa/ Não helicoidal	Células mononucleares de sangue periférico humano	$\uparrow$ na expressão de citocinas; aumento na atividade das células NK
<i>Lentinus edodes</i>	Cadeia principal de (1-3)- β -D-glucana com cadeias laterais ligadas em (1-6)- β	1490 kDa/ Tripla hélice	Camundongos BALB/c inoculados com células S-180	$\uparrow$ na atividade antitumoral
<i>Ganoderma lucidum</i>	(1-3)- β -D-glucana (altamente ramificado)	8 kDa/ -	Células CHO, células RAW 264.7; MO peritoneal murino	$\uparrow$ TNF- α e IL-6 dependentes de MAPKs e Syk; aumento na atividade antitumoral
<i>Poria cocos mycelia</i>	(1-3)- β -D-glucana	26–268 kDa/ Hélice simples	Célula tumoral de sarcoma 180	$\uparrow$ na expressão de citocinas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucana linear- β -(1-3)	38 kDa/ desconhecido	Células RAW 264.7 semelhantes a macrófagos	$\uparrow$ na produção de TNF- α e MCP-1

Desconhecido; P.M.: Peso molecular. Fonte: Adaptado de Han et al., 2020.

Por modificarem a resposta imune do organismo, as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas são classificadas como modificadores de resposta biológica (MRB). Diferentes receptores imunes ligados à membrana podem reconhecer as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas e a ligação ao receptor também depende da estrutura e natureza desses polissacarídeos (Mueller *et al.*, 2000).

A interação das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas com os receptores presentes nas células do sistema imunológico pode ativar a produção de citocinas, como IL-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa, que vão ser liberadas como resposta à exposição às (1→3)(1→6)-β-D-glucanas (Noss *et al.*, 2013). Esse processo ativa e regula a resposta imune adquirida, estimulando a defesa do hospedeiro (Mogensen, 2009). Os principais receptores de reconhecimento padrões (PRRs) envolvidos nessa resposta incluem o receptor do complemento 3 (CR3), o receptor de dectina-1 e os receptores Toll-like (TLR-2, TLR-4 e TLR-9), presentes em diversas células imunológicas, como monócitos, macrófagos, DCs, neutrófilos, eosinófilos e células NK, além de células epiteliais intestinais. Como a (1→3)(1→6)-β-D-glucana não é uma molécula produzida pelos mamíferos, ela é reconhecida como um padrão molecular associado a patógenos (PAMP) por esses receptores (Stier; Ebbeskotte; Gruenwald, 2014).

O primeiro receptor descrito na literatura para a ligação de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas foi o componente associado à membrana 1 (Mac-1), também conhecido como CR3 (Soltanian *et al.*, 2009). Esse receptor está presente na superfície de macrófagos, células NK, células da micróglia, neutrófilos, monócitos e alguns linfócitos (Brown; Gordon, 2001). A expressão do CR3 é regulada por IFN gama, IL-1, vitamina D3 e PGE2, com o IFN gama desempenhando um papel especialmente importante ao estimular sua expressão. Além disso, o IFN gama também promove a absorção da (1→3)(1→6)-β-D-glucana ligada, gerando um feedback negativo em caso de abundância e ativando a produção de TNF-α. Leucócitos que não possuem CR3 em sua superfície ainda respondem às (1→3)(1→6)-β-D-glucanas, o que sugere que o CR3 não é o receptor mais crucial para essa interação (Soltanian *et al.*, 2009). O CR3 funciona como um receptor

fagocítico para uma ampla gama de patógenos opsonizados e não opsonizados. Quando a (1→3)(1→6)-β-D-glucana se liga ao domínio de lectina do CR3, ocorre uma mudança conformacional mediada por uma via dependente de tirosina quinase e magnésio, o que expõe um epítipo e ativa o receptor. Essa ativação leva à fagocitose e à produção de radicais superóxido e citocinas. Embora o local de ligação da (1→3)(1→6)-β-D-glucana no CR3 tenha uma ampla especificidade para açúcares, apenas a interação com (1→3)(1→6)-β-D-glucanas resulta em ativação do receptor (Soltanian *et al.*, 2009).

O principal receptor de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas atualmente reconhecido é a dectin-1 (Brown; Gordon, 2001). Os receptores de lectina do tipo C pertencem a uma família maior de PRRs, cuja principal função é reconhecer PAMPs conservados e distinguir entre próprio e não-próprio, modulando assim as respostas imunes (Herre; Gordon; Brown, 2003). Embora Dectin-1 pertença estruturalmente à família das lectinas do tipo C, ele não funciona como uma lectina do tipo C convencional devido à sua especificidade de ligantes. Esse receptor foi descrito em camundongos, ratos, suínos, humanos e bovinos, sendo expresso na superfície de diversas células, incluindo DCs, macrófagos, monócitos, neutrófilos (Brown; Gordon, 2001; Herre; Gordon; Brown, 2003) e alguns subtipos de células T, como Th17, Th9 e células T citotóxicas tipo 17 (Tc17), dependendo do contexto imunológico (Alves *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2016). A ligação de Dectin-1 com seu ligante ativa várias vias de sinalização para promover respostas imunológicas inatas, através da ativação da fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e indução de citocinas inflamatórias (Willment; Gordon; Brown, 2001; Grunebach *et al.*, 2002). Essa ativação também contribui para a maturação das DCs, a fagocitose de outros ligantes, a explosão respiratória e o metabolismo do ácido araquidônico (Jin; Li; Wang, 2018).

Outros receptores e vias de sinalização ativados por (1→3)(1→6)-β-D-glucanas ainda não estão completamente caracterizados. Por exemplo, foi demonstrado que a lentinana, uma (1→3)(1→6)-β-D-glucana extraído de cogumelos, pode se ligar a receptores scavenger presentes na superfície de células mieloides, desencadeando a ativação das vias de sinalização da

fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), da quinase Akt e da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK). Contudo, até o momento, nenhum receptor scavenger específico para (1→3)(1→6)-β-D-glucanas foi identificado. Além disso, (1→3)(1→6)-β-D-glucanas derivadas de *Candida albicans* apresentam capacidade de se ligar ao receptor LacCer, ativando a via PI3K para regular a migração de neutrófilos (Chan; Chan; Sze, 2009).

Pesquisas recentes também descobriram a participação do TLR2 e TLR6 no reconhecimento de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas mediado por Dectin-1 (Silva *et al.*, 2024). Os TLRs (receptores tipo Toll) são PRRs essenciais para o reconhecimento de PAMPs, sendo expressos principalmente em macrófagos e DCs (Hemmi; Akira, 2005). Os TLRs são compostos por pelo menos 13 moléculas de sinalização da membrana, responsáveis por reconhecer sequências altamente conservadas nos PAMPs, o que resulta na ativação de sinais inflamatórios (Trinchieri; Sher, 2007). Com exceção de TLR3, TLR7 e TLR9, que estão localizados em endossomos, a maioria dos TLRs, como TLR2 e TLR4, são encontrados na superfície celular (Xiao; Zhou; Zhang, 2020). Dentre esses, TLR2 e TLR4 são principalmente expressos em macrófagos, células estreitamente associadas à inflamação e regulação imunológica. Os ligantes do TLR4 incluem principalmente LPS e ácido lipoteicóico, enquanto os ligantes do TLR2 são mais diversos (Iwasaki; Medzhitov, 2004). As (1→3)(1→6)-β-D-glucanas podem ter um efeito imunomodulador a partir de sua ligação aos TLR4 e TLR2 para ativar vias de sinalização intracelular, estimular a transcrição gênica e facilitando a liberação de citocinas por diferentes células do sistema imunológico. De maneira geral, a ativação dos TLRs (exceto TLR9) é essencial para o reconhecimento de ligantes microbianos, transmitindo sinais relacionados tanto ao auto-reconhecimento quanto ao não auto-reconhecimento. No entanto, essa ativação não desencadeia diretamente a fagocitose por macrófagos, indicando que os TLRs não devem ser considerados como receptores fagocíticos propriamente ditos (Barton; Kagan; Medzhitov, 2005).

O TLR2 interage diretamente com a (1→3)(1→6)-β-D-glucana, formando um complexo funcional com o TLR6, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas por meio das vias MyD88 e NF-κB. No entanto, grande parte desses dados foi obtida

em estudos com (1→3)(1→6)-β-D-glucanas quimicamente não purificadas (Soltanian *et al.*, 2009). Os sinais de TLR2 e Dectin-1 são essenciais para a ativação de NF-κB e a produção aumentada de citocinas inflamatórias, como TNF-α, IL-6 e IL-12 (Yaday; Schorey, 2006). A ativação do TLR4 por (1→3)(1→6)-β-D-glucanas desencadeia a sinalização do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), promovendo o acoplamento com a Dectina-1 e facilitando a fagocitose. Juntos, TLR4 e Dectina-1 atuam como receptores na superfície dos macrófagos, colaborando de forma sinérgica na ativação dessas células pela DIP, uma (1→3)(1→6)-β-D-glucana solúvel extraída do cogumelo da espécie *Dictyophora indusiata* (Deng *et al.*, 2017). O sinal de acoplamento entre Dectina-1 e TLR-MyD88 regula positivamente a produção de citocinas como TNF-α, IL-23, IL-10 e IL-6, enquanto modula negativamente a produção de IL-12, impactando o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Zhang *et al.*, 2022). A DIP possui atividade antitumoral ao ativar macrófagos e aumentar sua capacidade fagocítica, através da ativação da via MAPK, fosforilação da p65 do NF-κB e sua consequente translocação nuclear, estimulando a secreção de IL-1β e TNF-α (Deng *et al.*, 2017).

A ativação dos receptores através das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas leva à ativação da NF-κB também em outros tipos de células imunes. Diversos estudos têm demonstrado que as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas provenientes de diferentes fontes são capazes de induzir a produção de IFN-γ, tanto *in vitro* quanto *in vivo* em mamíferos (Javmen *et al.*, 2015). Em um estudo realizado por Budak, Göral e Oral (2008) foi demonstrado que a (1→3)(1→6)-β-D-glucana extraída da parede de *S. cerevisiae*, comercialmente disponível e licenciada para tratamento de suporte, levou a uma produção considerável de IFN-γ em células T de indivíduos saudáveis de maneira dependente de IL-12.

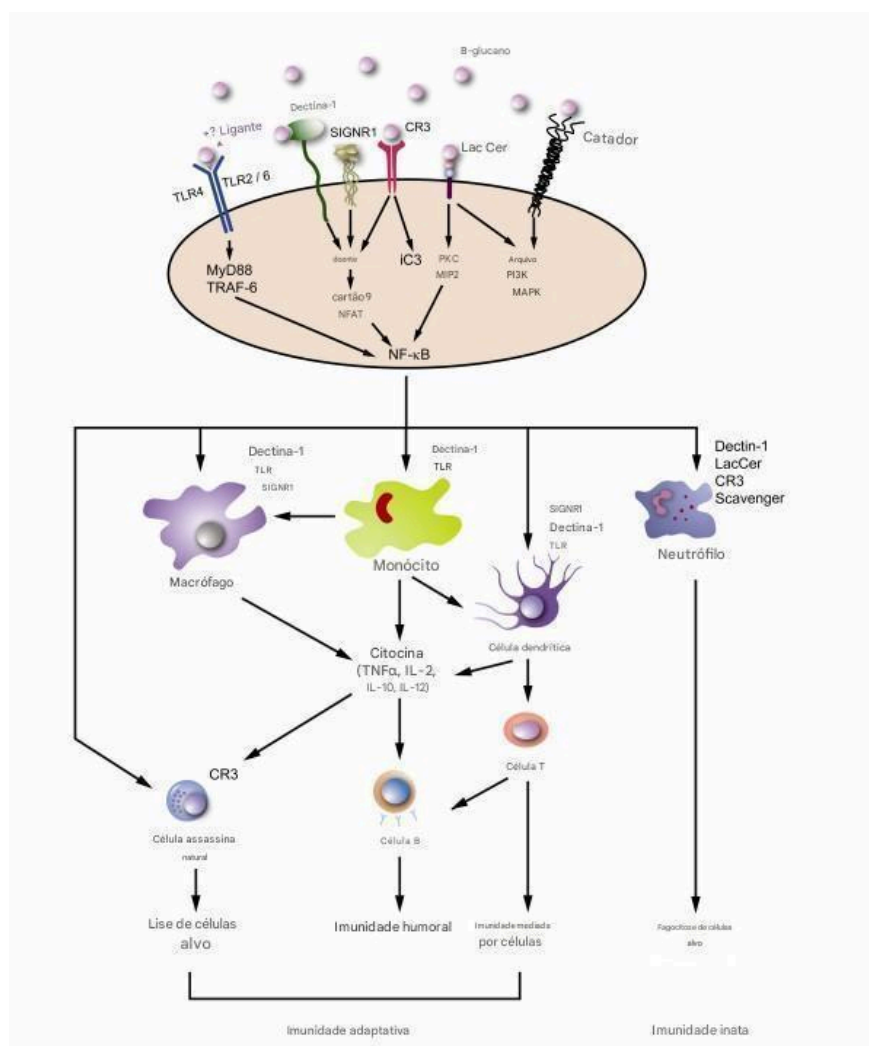


Figura 10. Vias de atuação das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas. As (1→3)(1→6)-β-D-glucanas podem atuar sobre uma variedade de receptores de membrana encontrados nas células do sistema imunológico. Eles podem agir isoladamente ou em diferentes ligantes. Diversas vias de sinalização são ativadas, e suas respectivas moléculas de sinalização a jusante, de forma simplificada, estão representadas na figura. As células-alvo incluem monócitos, macrófagos, células dendríticas, células NK (natural killer) e neutrófilos. Seus respectivos receptores de superfície são TLR2, TLR4, TLR6, SIGNR1, CR3, Dectina-1, Lac Cer e Scavenger. As funções imunomoduladoras induzidas pelas (1→3)(1→6)-β-D-glucanas envolvem tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa. As (1→3)(1→6)-β-D-glucanas também aumentam a fagocitose opsônica e não-opsônica e desencadeiam uma cascata de liberação de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e vários tipos de interleucinas (ILs). **Fonte:** Adaptado de Chan; Sze, 2009.

2.3.2 Ação antitumoral de β -glucanas

Pesquisas mostram atividade antitumoral significativa de (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas extraídas de leveduras nos estágios iniciais do câncer em modelos experimentais de sarcoma, devido principalmente a alta infiltração de linfócitos e macrófagos no microambiente tumoral, além de prevenção metastática e reparação da relação Th1/Th2 (Soltanian *et al.*, 2009). Foi relatado que esses polissacarídeos possuem potentes ações antitumorais, e o mecanismo antitumoral pode envolver a inibição do crescimento tumoral por meio do aprimoramento das funções imunes como a ativação de células T, células B, macrófagos e células NK, além de elevação dos níveis de citocinas, como interferons e interleucinas (Kimura *et al.*, 2006).

A fração de (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucanas derivada de aveia com 200 kDa (BG34-200) administrada por via oral foi capaz de diminuir significativamente o crescimento de tumores de melanoma B16-F10 e de osteossarcoma K7 M2-luc2, quando administrada por via intranasal, por estimular o aumento de células T CD4+, CD8+ e de IFN- γ intratumoral. Os mesmos autores também mostraram que o efeito antitumoral é dependente de DCs e de IFN- γ (Zhang *et al.*, 2018). A lentinana, uma (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucana extraída do cogumelo Shiitake e licenciada no Japão para terapia antitumoral desde 1985 (Wang *et al.*, 2017) foi capaz de potencializar o efeito da quimioterapia em humanos com câncer de pulmão (Zhang *et al.*, 2018) e gástrico (Ina *et al.*, 2011). Quando administrada via intraperitoneal em um modelo murino de câncer hepático, seu efeito antitumoral foi dependente do peso molecular de suas frações e da conformação em tripla hélice (Zheng *et al.*, 2017). Já a BG136, uma (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas com 6.9 kDa derivada da alga *Durvillaea antarctica* potencializou a ação de inibidores de PD1 em diferentes modelos murinos de câncer, incluindo melanoma B16-F10 (Su *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2024). Essa ação antitumoral no modelo experimental de melanoma ocorreu devido o aumento da infiltração de macrófagos pró-inflamatórios, linfócitos B e DCs no microambiente tumoral (Su *et al.*, 2019).

Uma importante fonte destes polissacarídeos é a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura amplamente empregada em processos industriais de fermentação (Magnani; Castro-Gómez, 2008) e como potencializadora da resposta imunológica no geral (Kim *et al.*, 2010). Sabe-se que (1→3)(1→6)-β-D-glucanas com ligações (1→3)(1→6) extraídas da *S. cerevisiae* possuem propriedades imunomoduladoras, permitindo sua aplicação na terapia antitumoral, pois exibem atividade anticancerígena *in vitro* e *in vivo* (Kim *et al.*, 2010). Essa (1→3)(1→6)-β-D-glucana exerce efeitos antitumorais sem toxicidade em células normais de camundongos, além de diminuir o crescimento tumoral após o tratamento *in vivo* de maneira dose-dependente (Mo *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

A (1→3)(1→6)-β-D-glucana particulada derivada de *S. cerevisiae* (*Whole β-glucan particle*, WGP) foi originalmente produzida pela Biothera, sendo atualmente comercializada pela Kerry Group com o nome comercial de Wellmune®. A WGP possui 150 kDa (Bose *et al.*, 2014), aproximadamente 20% de ramificações em β-(1→6) (Boutros, Magee; Cox, 2022) e conformação em tripla hélice (Li *et al.*, 2007). No geral, o número de moléculas de glicose nas ramificações varia de uma a duas nas (1→3)(1→6)-β-D-glucanas produzidas por *S. cerevisiae* (Aimanianda *et al.*, 2009). Ela é comercializada como imunomoduladora, e possui efeito comprovado na diminuição da frequência de resfriados e alergias em humanos (Feldman *et al.*, 2009; Fuller *et al.*, 2012; Talbott *et al.*, 2012; Fuller *et al.*, 2017; Talbott *et al.*, 2011; Talbott *et al.*, 2010). Quando administrada via oral em um modelo experimental murino de câncer de mama foi capaz de promover a diminuição do crescimento tumoral através da mudança do fenótipo de células T de Th2 para Th1, com aumento da produção de IFN gama e diminuição de IL-4 por essas células (Baran *et al.*, 2007). Em um protocolo de imunidade treinada, a WGP diminuiu os focos metastáticos e aumentou a sobrevida em camundongos C57BL/6 inoculados via endovenosa com células B16-F10 através da indução de imunidade treinada em macrófagos intersticiais pulmonares, mediada pela via de esfingosina-1-fosfato (S1P) e fissão mitocondrial, resultando em maior fagocitose e citotoxicidade contra as células tumorais (Ding *et al.*, 2023).

A Botriosferana (BOT) é uma (1→3)(1→6)-β-D-glucana exocellular produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Quando produzido em condições de fermentação com glicose como única fonte de carbono, a BOT apresenta cerca de 22% de ramificação em (1→6)-β, constituída de uma única molécula de glicose e/ou mais de uma molécula de glicose unida por ligações (1→6)-β (gentibiose). Possui conformação em tripla hélice e aproximadamente 1000 kDa (Dekker; Barbosa-Dekker, 2021). Apesar dos mecanismos pouco compreendidos sobre sua ação anti-inflamatória, é reconhecida sua atividade imunomoduladora (Silva *et al.*, 2022). Quanto a ação antitumoral, a administração oral da BOT no modelo experimental de tumor de Walker em ratos foi capaz de diminuir em 30% o volume tumoral, além de atenuar a caquexia oncológica em ratos obesos (Comiran *et al.*, 2020). No mesmo modelo experimental, o tratamento com a BOT por via oral também foi capaz de aumentar a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax, caspase-3 e caspase-7 no tecido tumoral (Geraldelli *et al.*, 2020). A característica mais atraente para a aplicabilidade terapêutica da BOT é a facilidade e o menor custo da sua produção comparado aos das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas já presentes no mercado, uma vez que são liberadas em meio de cultivo em condições de fermentação, podendo ser extraídas do sobrenadante através de metodologias simples, como precipitação e diálise (Dekker *et al.*, 2019).

Considerando que as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas de diferentes fontes possuem efeitos biológicos variados, uma investigação mais aprofundada sobre as propriedades antitumorais dessas moléculas *in vivo* permitirá, no futuro, o desenvolvimento de protocolos de tratamento que incluem esses polissacarídeos no combate ao melanoma e outros tipos de cânceres agressivos.

3. JUSTIFICATIVA

As (1→3)(1→6)-β-D-glucanas vêm se destacando como moléculas promissoras no combate ao câncer, sobretudo por sua reconhecida capacidade

de modular positivamente o sistema imunológico. Dentre os diversos tipos de neoplasias, o melanoma representa um dos maiores desafios terapêuticos da atualidade, caracterizado por uma elevada taxa de mortalidade e uma resposta limitada às terapias convencionais, incluindo imunoterapias com anticorpos monoclonais, que frequentemente falham em induzir respostas clínicas satisfatórias em uma parcela significativa dos pacientes. Nesse contexto, a identificação de novas estratégias terapêuticas, eficazes e acessíveis, torna-se essencial. As (1→3)(1→6)-β-D-glucanas despontam como candidatas ideais, não apenas por seus efeitos imunomodulatórios comprovados, mas também por apresentarem baixo custo de produção, ampla biodisponibilidade e aceitação em modelos experimentais, o que as diferencia positivamente de terapias baseadas em moléculas complexas e de alto custo. Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antitumoral de duas (1→3)(1→6)-β-D-glucanas fúngicas em um modelo murino experimental de melanoma, com ênfase na investigação da modulação da resposta imune antitumoral mediada por esses polissacarídeos. Ao elucidar seus mecanismos de ação e eficácia, este trabalho visa contribuir significativamente para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas inovadoras, acessíveis e mais eficazes para o tratamento do melanoma.

4. OBJETIVO GERAL

Comparar o efeito antitumoral das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas fúngicas extraída da parede celular de *S. cerevisiae* (Wellmune®) e produzida pelo fungo ascomiceto *B. rhodina* MAMB-05 (Botriosferana, BOT) na progressão do melanoma B16-F10 subcutâneo em camundongos C57BL/6.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos de diferentes vias de administração das (1→3)(1→6)- β -D-glucanas na progressão tumoral do melanoma em modelo experimental singênico de animais imunocompetentes;
- Determinar a dinâmica de citocinas e a expressão de genes relacionados à resposta imune antitumoral no tumor desses animais experimentais, bem como a extensão de necrose e o índice mitótico;
- Avaliar o papel dos receptores TLR2 e TLR4 no efeito antitumoral das (1→3)(1→6)- β -D-glucanas fúngicas na progressão do melanoma em modelo experimental com animais *knockout*.
- Determinar se o efeito antitumoral das (1→3)(1→6)- β -D-glucanas fúngicas avaliadas são dependentes da produção da citocina IFN- γ , utilizando modelo experimental com animais *knockout*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção de (1→3)(1→6)- β -D-glucanas

A Botriosferana (BOT) foi produzida em condições de fermentação submersa pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 utilizando sacarose como única fonte de carbono (Dekker *et al.*, 2021). Após 72 horas de crescimento a 28°C, as culturas fúngicas foram colhidas por centrifugação (7000 x g/10 min/4°C), e o sobrenadante foi separado do micélio. A BOT presente no meio de cultura foi precipitada com três vezes o volume de etanol, filtrada e, em seguida, solubilizada em água destilada (60°C/2 h sob agitação contínua). A solução (1→3)(1→6)- β -D-glucana obtida foi então dialisada em água destilada por 48 horas e subsequentemente liofilizada. A (1→3)(1→6)- β -D-glucana extraída da parede celular de *S. cerevisiae* (Wellmune®) foi obtida do Kerry Group, América Latina.

5.2 Animais Experimentais e delineamento experimental

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 selvagem (*wild-type*, WT), com idade entre 7-10 semanas e peso corporal de aproximadamente 30 gramas, foram obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e devidamente alojadas no Biotério Setorial de Experimentação Animal do Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar do ICB/UFMG, em gaiolas de polipropileno (30x20x13 cm), sob temperatura de 22±2 °C, umidade de 50%, e ciclo de luz-escuro de 12 horas, com acesso *ad libitum* à água e ração comercial autoclavável (n=40). Camundongos machos e fêmeas entre 7 - 9 semanas de idade deficientes (*knockouts*, KO) para receptores Toll-like (TLR2^{-/-}, n=12, TLR4^{-/-}, n=14) e para receptores Interferon gamma (IFN-γ^{-/-}, n=21) foram gentilmente doados pelo pesquisador Sergio Costa Oliveira (Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil), e mantidos em condições livres de patógenos durante todo o experimento. Como controle para esses experimentos utilizando os animais KO, foram utilizados 36 camundongos fêmeas C57BL/6 WT. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo nº 328/2022).

5.3 Cultura de células tumorais

As células B16-F10 foram gentilmente doadas pelo pesquisador Enio Ferreira, do Departamento de Patologia Geral/UFMG. foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM, Gibco - 12100-046, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco - 12657-029) e 1% de solução Antibiótica-Antimicótica (Gibco - 15240062), mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

5.4 Modelo murino de melanoma subcutâneo

As células B16-F10 foram cultivadas até atingir 70-80% de confluência, e então foram destacadas da garrafa de cultura com tripsina-EDTA, lavadas duas vezes em DMEM sem SFB e ressuspensas em DMEM sem SFB em GeltrexTM (membrana basal com fatores de crescimento reduzidos; Thermo Fisher Scientific) na proporção 1:1, na concentração de 2×10^6 células/mL. Foi realizada a tricotomia da região do flanco direito dos animais, seguida de assepsia com álcool 70%. Após homogeneizar a suspensão celular, 100 μ L da solução (2×10^5 células) foram inoculados no tecido subcutâneo dos camundongos C57BL/6.

5.5 Delineamento experimental e avaliação do crescimento tumoral

Os animais foram tratados por via oral (gavagem) ou intraperitoneal com as (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas Botriosferana e Wellmune[®] a partir do quinto dia da inoculação tumoral. Em um estudo piloto, observou-se uma pequena massa tumoral no subcutâneo dos animais no 5º dia após inoculação de 2×10^5 células B16-F10. As soluções de (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas foram preparadas em salina estéril e administradas na dose de 30 mg/kg (Ding *et al.*, 2023), e o tratamento se repetiu a cada 3 dias até o momento da eutanásia no 17º dia. Para os animais do grupo controle, foi padronizada a administração oral de 100 μ L de solução salina nos mesmos tempos experimentais. No 17º dia após a inoculação das células tumorais, os animais foram eutanasiados com 80 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina. Os tumores foram removidos cirurgicamente e armazenados adequadamente para as análises descritas nas seções 5.6, 5.7 e 5.8. O mesmo esquema experimental foi aplicado aos camundongos TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e IFN- γ ^{-/-}. O

crescimento tumoral foi monitorado diariamente a partir do décimo dia pós-inoculação das células B16-F10, medindo o diâmetro perpendicular do tumor com paquímetro digital, e o volume calculado pela fórmula $V \text{ (mm}^3\text{)} = 1/2 \text{ (comprimento} \times \text{largura}^2\text{)}$ (Gast *et al.*, 2018).

5.6 Análises histopatológicas

Um fragmento representativo do tumor de cada animal WT, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e IFN- γ ^{-/-} foi fixado em formol tamponado por 48 horas, incluído em parafina e seccionado em cortes de 5 μm para preparo de lâminas histológicas. Posteriormente, os tecidos foram desparafinizados e corados com hematoxilina e eosina para análise histopatológica, incluindo contagem de mitoses e área de necrose. Para a determinação da proliferação celular, foram obtidas imagens de campo claro (objetiva 40X, microscópio Olympus BX41 acoplado a câmera SPOT Insight Color) de 5 áreas "*hotspots*" para mitoses, totalizando 1 mm². A área de necrose foi avaliada semi-quantitativamente através de um escore, sendo: 0 = sem necrose, 1 = 1-25%, 2 = 26-50% e 3 = >51% na área do tecido avaliado.

5.7 Análise do perfil de citocinas intratumorais por *Cytometric Bead Array* (CBA)

Um fragmento representativo do tumor de cada animal WT armazenado a -80°C foi pesado e homogeneizado em solução tampão contendo inibidor de protease (cOmplete ULTRA Tablets, Mini EDTA-free, EASY-pack), utilizando um disruptor de tecidos (50Hz por 15 minutos). As amostras foram mantidas no gelo e centrifugadas a 8.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e avaliado para 6 citocinas em duplicata usando o kit Human Inflammatory Cytokine

(Cytometric Bead Assay, BD Biosciences), conforme as instruções do fabricante. A análise foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences), e os dados analisados com o software FCAP array v3 (BD Biosciences). O conteúdo de proteína total dos homogenatos foi quantificado pelo método de Bradford, e os resultados expressos em pg/mg de proteína.

5.8 Expressão de genes relacionados à resposta imune antitumoral

Um fragmento representativo do tumor de cada animal WT armazenado a -80°C em Trizol (Invitrogen) foi pesado e homogeneizado para isolamento de RNA total conforme instruções do fabricante. A transcrição reversa foi realizada no equipamento Veriti 96Well Thermal Cycler usando 2 µg de RNA total em volume final de 20 µL contendo oligo-dT (0,5 µg/µL), dNTP 10 mM, DTT 0,1 M, tampão 5x e transcriptase reversa (2 U por reação), com os seguintes parâmetros: 42°C por 60 min e 70°C por 15 min utilizando o kit High-Capacity cDNA reverse transcription (Thermo Fisher Scientific). O cDNA resultante foi utilizado como molde para qPCR, em volume final de 10 µL contendo SYBR Green PCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific, 4309155) e 5 µM dos seguintes primers:

Quadro 1. Sequências de primers utilizados na análise por qPCR de genes relacionados a resposta imune antitumoral.

Gene alvo	Sequência primer forward (5'→3')	Sequência primer reverse (5'→3')	ID gene
18s	5'-CTCAACACGGGAAACC TCAC-3'	5'-CGCTCCACCAACTAAG AACG-3'	18s (housekeeping)
Ifnb1	5'-AGCTCCAAGAAAGGAC GAACAT-3	5'-GCCCTGTAGGTGAGGT TGATCT-3'	IFN-β
Nos2	5'-AGCACTTTGGGTGACC ACCAGGA-3'	5'-AGCTAAGTATTAGAGC GGCGGCA-3'	Óxido Nítrico Sintase Induzível

Arg1	5'-TGACATCAACACTCCC CTGACAAC-3'	5'-GCCTTTTCTTCCTTCC CAGCAG-3'	Arginase
Retnia	5'-CCCTCCACTGTAACGA AGACTC-3'	5'-CACACCAGTAGCAGTC ATCC-3'	Resistin-like alpha (Fizz1)
Ptgs2	5'-GATGCTCTTCCGAGCT GTG-3'	5'-GGATTGGAACAGCAAG GATTT-3'	Ciclooxigenase-2
Il12a	5'-ACGCTACCTCCTCTTTT TGGC-3'	5'-GGGACTGGCTAAGACA CCTGG-3'	Interleucina-12

As reações de qPCR foram realizadas no sistema StepOnePlus Real-TimePCR System com os seguintes parâmetros: 60°C por 10 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, seguido da curva de dissociação. Os dados foram analisados pelo método $2^{(-\Delta\Delta CT)}$, que estima a expressão relativa dos genes como "fold change", após normalização para o gene de referência (18S) (Rao *et al.*, 2015). As medições foram realizadas em duplicata.

5.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 9.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e o teste de ROUT aplicado para a identificação de *outliers*. Os grupos tratados foram comparados com o grupo controle usando testes paramétricos ou não-paramétricos, conforme apropriado (One-way ANOVA com *post test* de Dunnett ou Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn, respectivamente). As curvas de crescimento tumoral foram analisadas por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett para comparação entre os grupos tratados e o grupo controle. Resultados com $p \leq 0,050$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1 A ação antitumoral da Botriosferana é dependente da via de administração oral

Os animais com melanoma foram tratados ou não com a Botriosferana (BOT) ou a Wellmune (WM) por via oral ou intraperitoneal (IP) na dose de 30 mg/kg a partir do 5º dia de inoculação de 2×10^5 células B16-F10 no tecido subcutâneo. O delineamento experimental pode ser visualizado na Figura 11A. O tratamento com a BOT por via oral diminuiu o volume tumoral a partir do 14º dia, sendo que a WM por via oral e IP reduziu no 17º dia. O grupo BOT IP não apresentou redução do volume tumoral ao longo de todo tempo experimental (Figura 11B). Ao final do experimento, o peso tumoral diminuiu 38,80% e 37,13% com os tratamentos com a WM por via oral e IP, respectivamente, e 56,84% no grupo BOT oral (Figura 11C), sendo apenas este último estatisticamente significativo ($0,750 \pm 0,100 \times 1,737 \pm 0,264$ gramas, $p=0,005$, grupos BOT oral e controle, respectivamente). Não foi possível observar alterações na área de necrose tumoral em nenhum dos tratamentos realizados (Figura 11D), entretanto, em todos os grupos tratados com as $(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)$ - β -D-glucanas o índice mitótico foi aproximadamente 50% inferior comparado ao grupo controle (grupo controle: $45 \pm 3 \text{ mm}^2$; grupo BOT oral: $22 \pm 3 \text{ mm}^2$, $p=0,001$; grupo BOT IP: $22 \pm 3 \text{ mm}^2$, $p=0,000$; grupo WM oral: $25 \pm 2 \text{ mm}^2$, $p=0,001$; grupo WM IP: $29 \pm 4 \text{ mm}^2$, $p=0,007$) (Figura 11E).

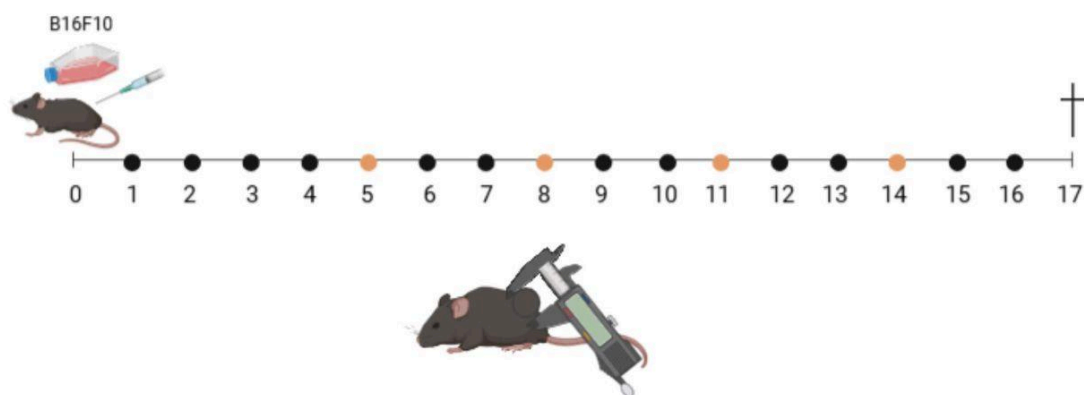
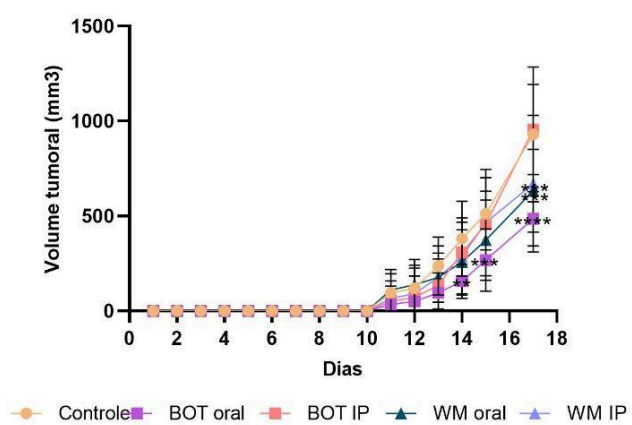
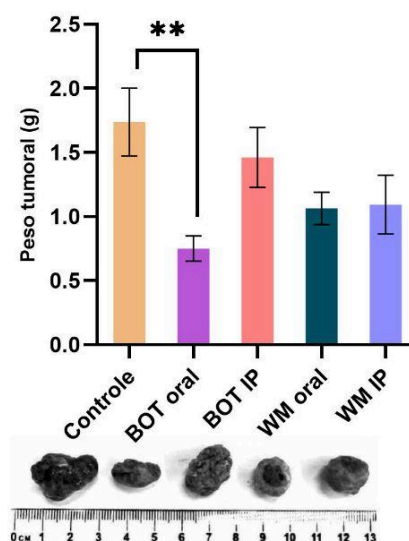
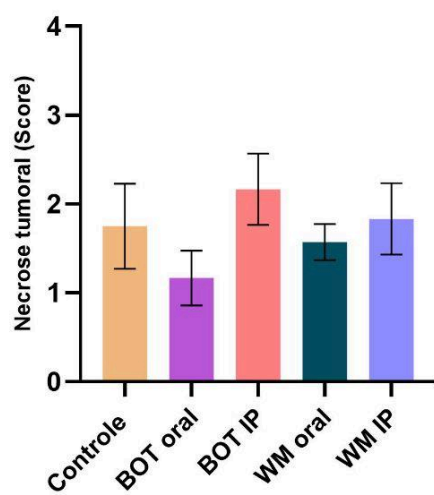
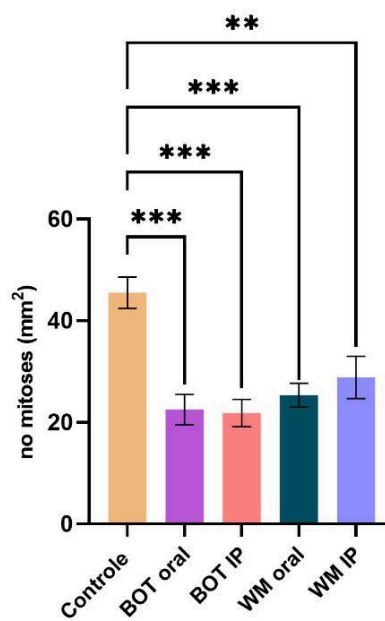
A**B****C****D****E**

Figura 11. Ação dos tratamentos com (1→3)(1→6)-β-D-glucana no desenvolvimento tumoral de melanoma B16-F10 subcutâneo em camundongos C57BL/6 WT. Camundongos C57BL/6 WT fêmeas foram inoculadas no tecido subcutâneo do dorso com 2×10^5 células de melanoma B16-F10. Os tratamentos com salina por via oral (grupo controle), 30 mg/Kg de Botriosferana por via oral (grupo BOT oral) ou intraperitoneal (grupo BOT IP), 30 mg/Kg de Wellmune por via oral (grupo WM oral) ou intraperitoneal (grupo WM IP) foram realizados nos dias 5, 8, 11 e 14 após a implantação tumoral. Os animais foram eutanasiados no 17º dia e os tumores removidos para análises. **A)** Delineamento experimental; **B)** Curva de crescimento tumoral; **C)** Peso tumoral no 17º dia experimental; **D)** Escore de necrose tumoral e **E)** Número de mitoses em mm² no tumor. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 9.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e o teste de ROUT aplicado para a identificação de *outliers*. Os grupos tratados foram comparados com o grupo controle usando testes paramétricos ou não-paramétricos, conforme apropriado (One-way ANOVA com *post test* de Dunnett ou Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn, respectivamente). As curvas de crescimento tumoral foram analisadas por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett para comparação entre os grupos tratados e o grupo controle. Resultados com $p \leq 0,050$ foram considerados estatisticamente significativos.

Conforme apresentado nas Figuras 11E e 12, a análise da necrose tecidual tumoral não evidenciou diferenças expressivas entre os grupos experimentais. Observou-se que os animais tratados com WM, independentemente da via de administração, assim como aqueles que receberam BOT IP, apresentaram escore de necrose próximo a 2 (26% a 50%), valor semelhante ao do grupo controle. Por outro lado, os animais tratados com BOT oral mantiveram escore próximo a 1 (1% a 25%). Apesar da tendência de diminuição de necrose tecidual no grupo tratado com BOT oral, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

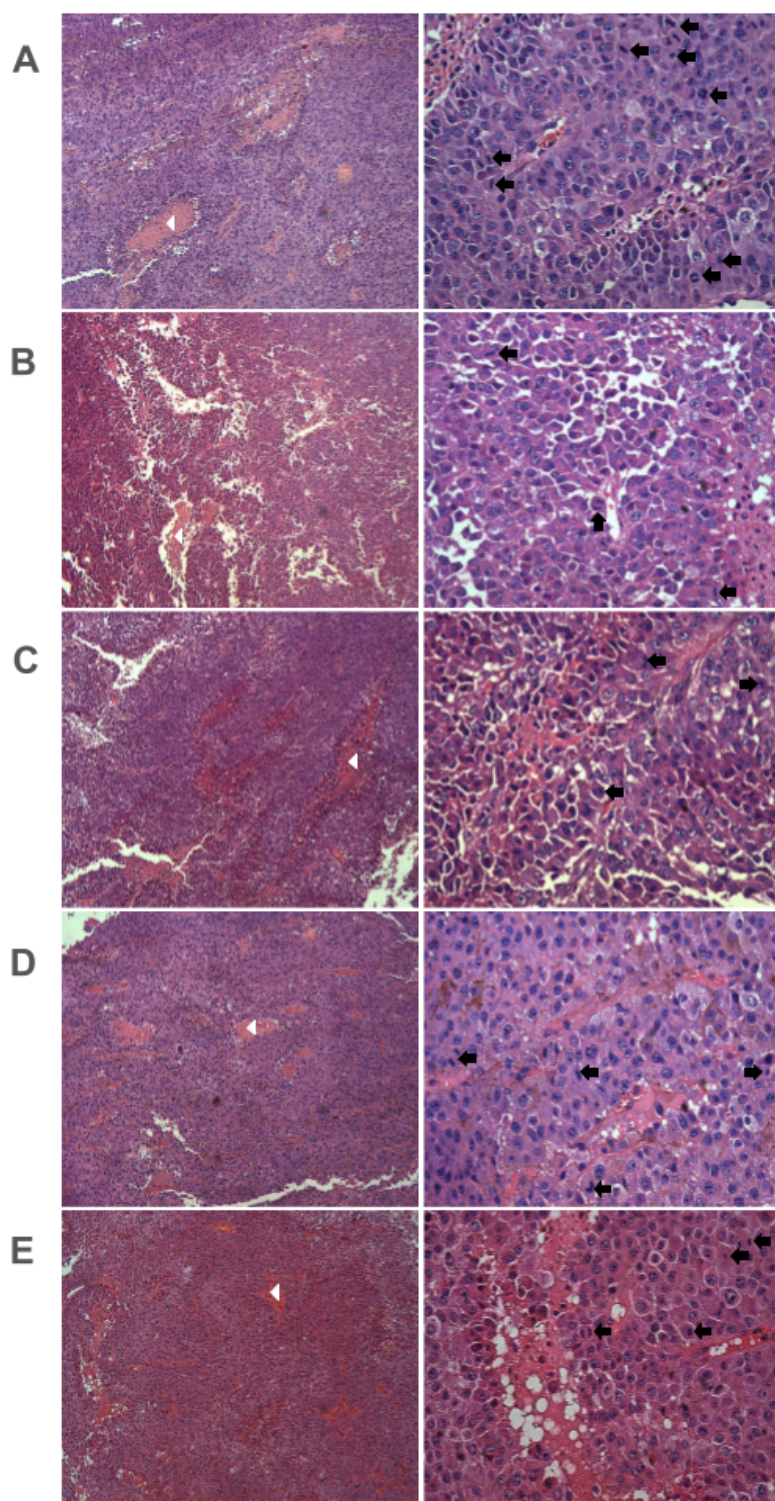


Figura 12. Imagens representativas da necrose e do índice mitótico no tecido tumoral. **A)** Grupo controle, 100 X e 400 X; **B)** Grupo BOT oral, 100 X e 400 X; **C)** Grupo BOT IP, 100 X e 400

X; **D)** Grupo WM oral, 100 X e 400 X e **E)** Grupo WM IP, 100 X e 400 X. Setas pretas: mitose; Cabeça de seta branca: necrose. Coloração com H&E.

6.2 O tratamento por via oral com Botriosferana aumenta a produção de IFN- γ e Wellmune oral aumenta a expressão genica de IFN tipo I no microambiente tumoral

As análises dos níveis de citocinas presentes nos tumores subcutâneos dos animais tratados ou não com as (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas, após 17 dias de inoculação tumoral, demonstraram que o grupo tratado com BOT oral apresentou aumento de aproximadamente 2,2 vezes nos níveis de TNF- α e IL-2 em relação ao grupo controle, embora sem significância estatística. Já a citocina IFN- γ no grupo BOT oral apresentou-se três vezes maior em comparação ao grupo controle, como pode ser observado na Tabela 3 ($p = 0,048$). Em contrapartida, as demais citocinas avaliadas (IL-4, IL-6 e IL-10) não apresentaram alterações tão acentuadas em relação ao grupo controle para os grupos tratados com BOT. Por sua vez, o tratamento com a WM por via oral diminuiu 3,5 vezes os níveis de IL-6 intratumoral, enquanto o tratamento IP aumentou em 1,5 vezes os níveis dessa citocina no microambiente tumoral, embora essas alterações não tenham sido estatisticamente significativas.

Tabela 4. Níveis de citocinas intratumorais nos tumores subcutâneos de melanoma B16-F10 de animais tratados ou não com (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas

Grupo	IFN- γ pg/ mg proteína $\pm$ EPM	TNF- α pg/ mg proteína $\pm$ EPM	IL-2 pg/ mg proteína $\pm$ EPM	IL-10 pg/ mg proteína $\pm$ EPM	IL-4 pg/ mg proteína $\pm$ EPM	IL-6 pg/ mg proteína $\pm$ EPM
Controle	0,155 $\pm$ 0,040	1,057 $\pm$ 0,162	0,144 $\pm$ 0,022	0,572 $\pm$ 0,253	0,091 $\pm$ 0,049	4,920 $\pm$ 2,085
BOT oral	0,504 $\pm$	2,209 $\pm$ 0,702	0,349 $\pm$ 0,094	0,745 $\pm$ 0,234	0,083 $\pm$ 0,040	3,772 $\pm$ 1,843

	0,130*					
BOT IP	0,299 ± 0,104	1,283 ± 0,143	0,301 ± 0,014	0,477 ± 0,117	0,034 ± 0,017	2,919 ± 0,605
WM oral	0,233 ± 0,039	1,006 ± 0,302	0,484 ± 0,152	0,515 ± 0,255	0,115 ± 0,040	1,419 ± 0,314
WM IP	0,255 ± 0,049	1,018 ± 0,290	0,472 ± 0,147	0,465 ± 0,194	0,109 ± 0,045	7,656 ± 4,300

EPM: Erro padrão da média. * $p < 0,050$ comparado ao grupo controle.

A análise da expressão gênica por qPCR evidenciou alterações imunomodulatórias associadas aos tratamentos com (1→3)(1→6)-β-D-glucanas, com variações em função do tipo da (1→3)(1→6)-β-D-glucanas e da via de administração do composto. A expressão gênica de *Ifnb1*, que codifica IFN-β, teve sua expressão aumentada significativamente ($p=0,023$) no grupo WM oral comparado ao grupo controle (Fold change $93,57 \pm 47,62$ e $9,180 \pm 6,874$, respectivamente) e um aumento de 7,8 vezes na expressão do gene *il12a*, não significativa estatisticamente (Fig. 11 A e B). A expressão de genes associados ao fenótipo M2 de macrófagos, *Arg1* e *Retnla*, apresentaram-se levemente aumentadas nos grupos tratados com WM, tanto por via oral quanto IP (Fig. 11 C e D). Em contrapartida, a expressão gênica de *Nos2* e *Ptgs2*, envolvidos no fenótipo M1 de macrófagos, apresentaram-se levemente aumentados principalmente no grupo WM IP (Fig. 11 E e F).

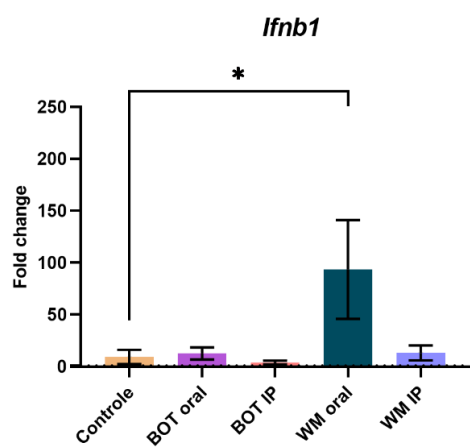
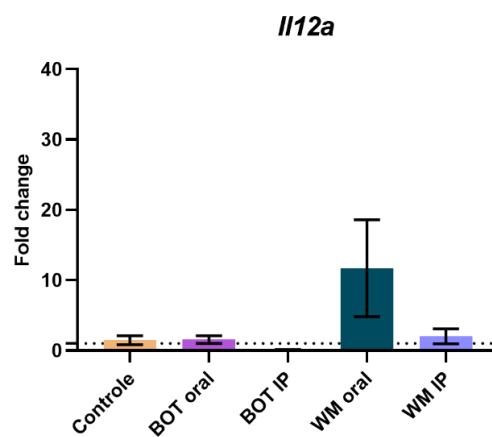
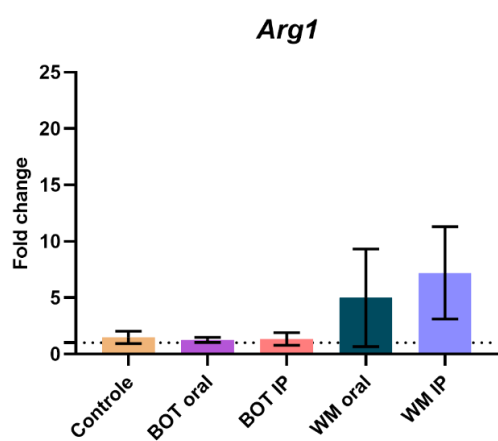
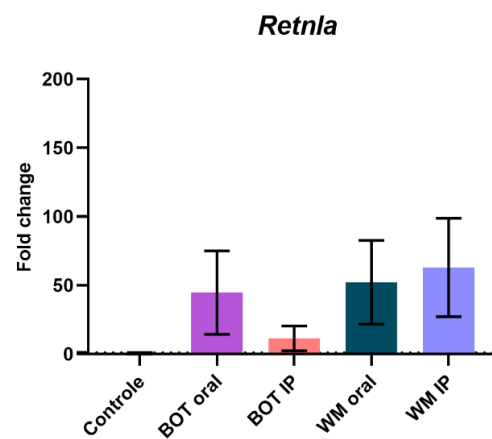
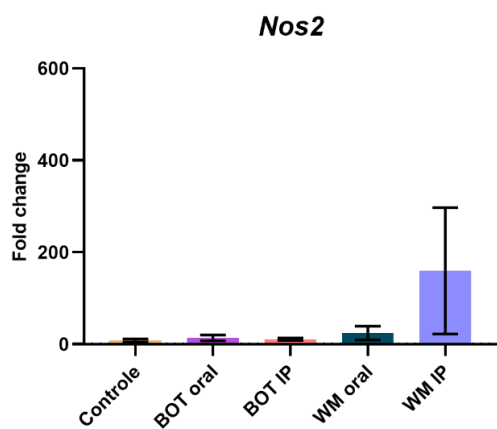
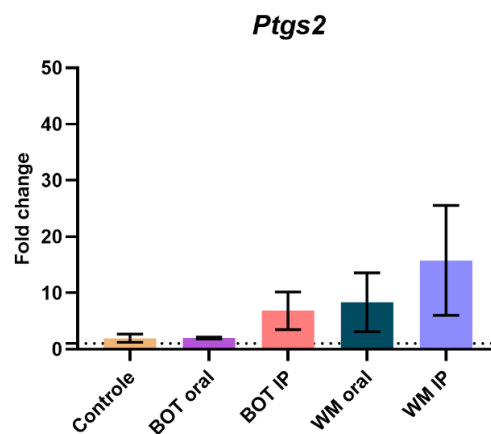
A**B****C****D****E****F**

Figura 13. Ação dos tratamentos com (1→3)(1→6)-β-D-glucanas na expressão de genes relacionados à resposta imune no melanoma subcutâneo em camundongos C57BL/6 WT. A-F) Fold change da expressão dos seguintes genes: Ifnb1 (A), Il12a (B), Arg1 (C), Retnia (D), Nos2 (E) e Ptgs2 (F).

6.3 A ação antitumoral da Botriosferana e da Wellmune é dependente de receptores TLR2, TLR4 e IFN-γ

Para avaliar se os efeitos da redução tumoral nos animais tratados com Botriosferana e Wellmune por via oral seriam dependentes dos receptores TLR2 e TLR4, previamente descritos na literatura como receptores de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas, foram utilizados camundongos deficientes para esses receptores (TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}). A escolha da via oral para os tratamentos foi fundamentada nos resultados dos experimentos realizados com animais WT, onde os grupos tratados por essa via apresentaram respostas mais favoráveis em comparação aos grupos tratados via IP. Como ilustrado na Figura 14A, observamos que após 17 dias de tratamentos o peso tumoral permaneceu semelhante ao grupo controle nos animais TLR2^{-/-}. No modelo experimental com camundongos TLR4^{-/-}, o efeito antitumoral da BOT oral também não foi observado e no grupo tratado com WM oral o peso do tumor aumentou de forma estatisticamente significativa em relação a grupo controle ($3,719 \pm 0,403$ e $1,604 \pm 0,043$, respectivamente, $p = 0,001$). Por fim, no modelo experimental com camundongos IFN-γ^{-/-}, também não foram observadas diferenças no peso do tumor ao final do tempo experimental em relação ao grupo controle, assim como também não foi observada diminuição do índice mitótico nos tratamentos com BOT e WM por via oral. Em conjunto, os nossos resultados demonstram que o melhor desempenho entre os tratamentos foi utilizando a BOT oral e que tanto os receptores da imunidade inata TLR2 e TLR4 quanto IFN-γ, citocina efetora da imunidade adaptativa, são essenciais para o efeito antitumoral da BOT oral.

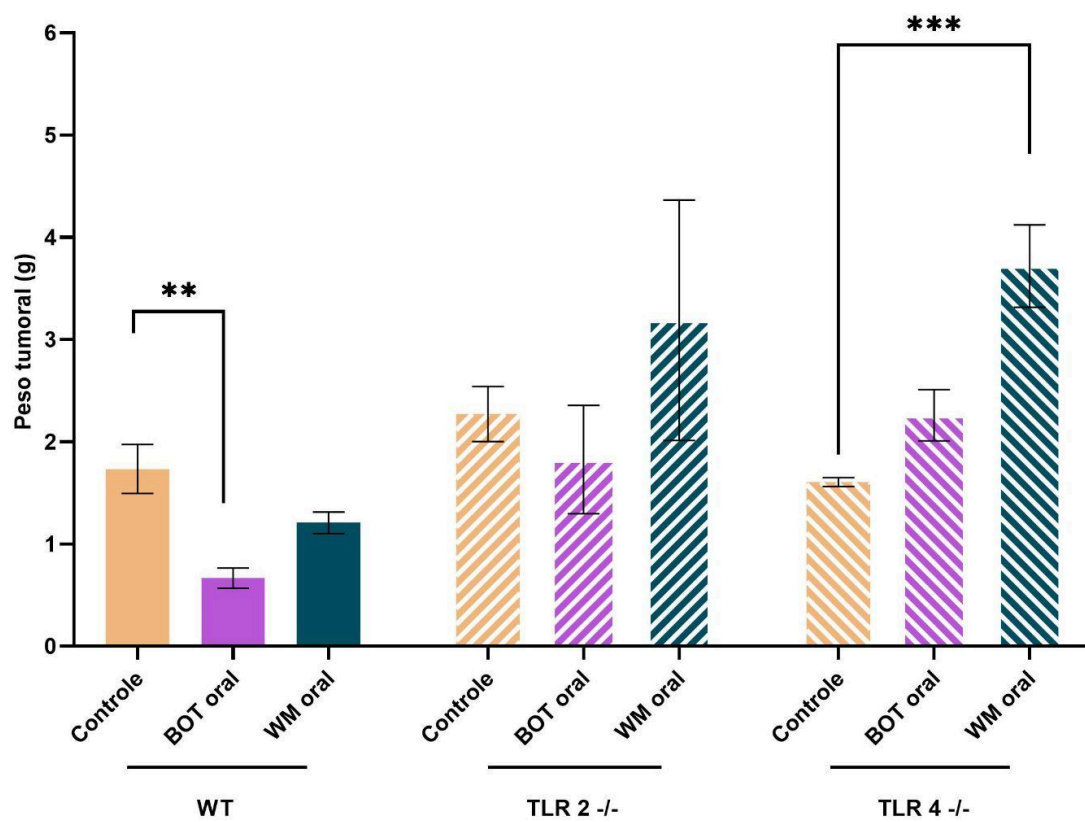
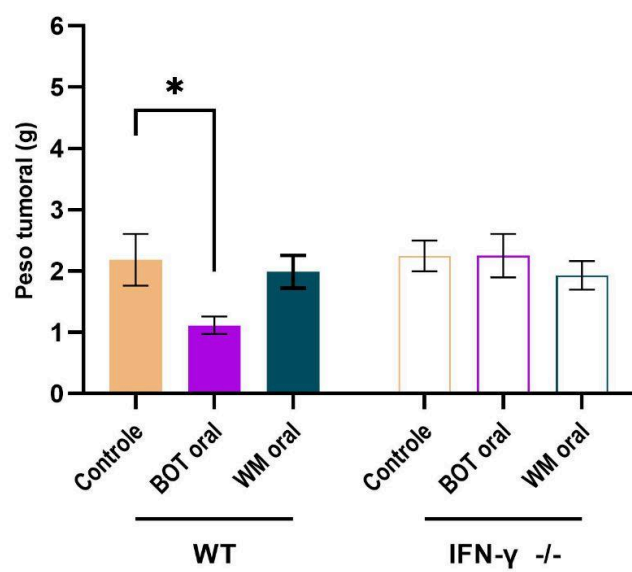
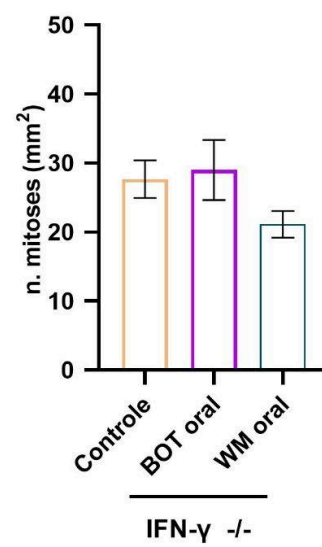
A**B****C**

Figura 14. Avaliação dos diferentes tratamentos com (1→3)(1→6)-β-D-glucanas em melanoma subcutâneo comparando camundongos C57BL/6 WT com animais deficientes TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e IFN-γ^{-/-}. A-B) Peso tumoral (g) de melanoma em animais WT comparados com TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} (A) ou IFN-γ^{-/-} (B). C) Número de mitoses por mm² no tecido tumoral de animais IFN-γ^{-/-}. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 9.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e o teste de ROUT aplicado para a identificação de *outliers*. Os grupos tratados foram comparados com o grupo controle usando testes paramétricos ou não-paramétricos, conforme apropriado (One-way ANOVA com *post test* de Dunnett ou Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn, respectivamente). Resultados com p≤0,050 foram considerados estatisticamente significativos.

7. DISCUSSÃO

As (1→3)(1→6)-β-D-glucanas possuem atividades imunomodulatórias específicas, influenciadas por sua estrutura molecular, origem e conformação (Brown, 2005; Brown *et al.*, 2003), além da via de administração (He *et al.*, 2022), o que pode explicar as variações nos efeitos terapêuticos observados. Os resultados obtidos reforçam que não apenas a fonte de obtenção mas também a via de administração exerce papel determinante na atividade imunomoduladora dessas moléculas bioativas, com destaque para sua aplicação terapêutica no tratamento antitumoral. No caso da BOT, a via de administração se demonstrou importante, uma vez que os efeitos antitumorais não foram observados no tratamento intraperitoneal (IP). Nossos resultados corroboram com evidências da literatura que apontam que a fonte de obtenção e a via de administração de (1→3)(1→6)-β-D-glucanas pode exercer impacto significativo sobre sua atividade terapêutica (Song *et al.*, 2024; Su *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2017), provavelmente em função de diferenças na biodisponibilidade e na ativação de receptores imunes e vias de sinalização distintas (Brown, 2005; Brown *et al.*, 2003).

Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas na área de necrose tumoral entre os grupos experimentais, a redução consistente da proliferação celular sugere que os efeitos antitumorais

das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas avaliadas podem estar mais relacionados à modulação do ciclo celular do que à indução direta de necrose. Já foi demonstrado que as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas podem exercer atividade antiproliferativa direta ao induzir a parada do ciclo celular na fase G0/G1 em linhagens celulares de câncer de mama e colorretal (Jedinak *et al.*, 2011), bem como promover apoptose, necrose e autofagia em promastigotas de *Leishmania amazonensis in vitro* (Carloto *et al.*, 2022). Esses achados indicam um potencial efeito citotóxico direto dessas moléculas, além de sua já reconhecida ação imunomodulatória. Nesse mesmo contexto, a BOT demonstrou efeitos semelhantes em células de câncer de mama, sendo capaz de induzir citotoxicidade, interromper o ciclo celular em G0/G1, além de aumentar significativamente a atividade das caspases 3 e 7 e a expressão do gene pró-apoptótico Bax (Queiroz *et al.*, 2015). Esses resultados reforçam o potencial antitumoral direto das β-D-glucanas, o que justifica a ampliação de estudos com essa classe de polissacarídeos em outros modelos tumorais. O efeito citostático *in vitro* da BOT também foi observado em células de leucemia (Malini *et al.*, 2015). Todos os grupos tratados com a BOT e a Wellmune (WM) apresentaram uma redução significativa no índice mitótico em comparação ao grupo controle, indicando menor taxa de proliferação tumoral. Esses achados reforçam a hipótese de que o efeito antitumoral das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas está em parte associado à inibição da proliferação celular, uma vez que a diminuição do número de mitoses não reduziu o peso tumoral em todos os grupos experimentais. Uma possível explicação é que a BOT administrada por via oral além do efeito citostático também apresenta efeito pró-apoptótico, uma vez que já foi mostrado que a BOT administrada por via oral na mesma dose utilizada neste estudo foi capaz de aumentar os níveis da proteína pró-apoptótica Bax no tumor de Walker-256 em ratos (Geraldelli *et al.*, 2020). Ademais, a (1→3)(1→6)-β-D-glucana lentinana, isolada do cogumelo *Lentinus edodes*, foi capaz de reduzir o crescimento do sarcoma S-180 em cerca de 75%, além de induzir apoptose nas células cancerosas e favorecer a infiltração de células do sistema imune no microambiente tumoral (Xu *et al.*, 2016).

As (1→3)(1→6)-β-D-glucanas fúngicas se ligam a receptores específicos em células do sistema imune inato, como Dectin-1, TLRs e CR3, ativando vias de sinalização que promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6 (Brown; Gordon, 2005; Goodridge *et al.*, 2009). Essa interação desempenha um papel fundamental na coordenação das respostas antitumorais, atuando na ativação e recrutamento de células efetoras do sistema imune inato e adaptativo, como macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos (CD8+). Como extensivamente revisado por Kim e colaboradores (2011) a (1→3)(1→6)-β-D-glucana lentinana estimula macrófagos e a maturação funcional das células dendríticas, o que leva ao aumento significativo da secreção de IL-12, citocina crucial para a indução de uma resposta Th1 robusta, com a produção de IFN-γ, por exemplo. O aumento de aproximadamente 2 vezes nos níveis de TNF-α e IL-2 no 17º dia experimental no grupo tratado com a BOT por via oral reflete o aumento significativo dos níveis de IFN-γ, mostrando a integração do sistema imune inato e adaptativo. O IFN-γ é reconhecido por seu papel central na resposta imune antitumoral, podendo exercer atividade citotóxica direta sobre células tumorais ao induzir autofagia letal. Embora comumente associada à sobrevivência celular, a autofagia induzida por IFN-γ, por meio da ativação do fator IRF-1, pode levar à morte celular programada (Qian *et al.*, 2011). Esses mecanismos destacam o IFN-γ como um agente efetor direto na destruição de células neoplásicas. Além disso, ele promove a ativação de células T CD8⁺ e células NK, bem como a expressão de moléculas do MHC classe I, facilitando o reconhecimento e a eliminação de células tumorais por meio da indução de apoptose (Ikeda *et al.*, 2002). O IFN-γ também exerce um efeito antiproliferativo significativo sobre as células tumorais, atuando na interrupção do ciclo celular — especialmente nas fases G1/G0 — ao aumentar a expressão de proteínas inibidoras das quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (Chen; Niu; Xue, 2023). Portanto, o aumento significativo de IFN-γ intratumoral observado nos animais tratados com a BOT por via oral no 17º dia experimental mostra uma modulação positiva da resposta imune antitumoral, reforçada pela diminuição do volume e peso tumoral.

A modulação da expressão gênica de IFN- β e IL-12 também se mostrou dependente da via de administração, como no caso do tratamento com WM. Tais achados estão em concordância com dados da literatura, que apontam a via oral como uma estratégia eficaz para potencializar a resposta imunológica induzida pelas (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas. Estudos prévios mostraram que quando partículas de (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas derivadas de *S. cerevisiae* (WGP) são administradas por via oral, elas passam ilesas pelo trato gastrointestinal e são captadas por macrófagos intestinais. Nesses fagócitos, a WGP é processada em fragmentos bioativos de β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana, que são então transportados para a medula óssea, o baço e os linfonodos de drenagem, onde interagem com outras células do sistema imune, promovendo a ativação coordenada das respostas inata e adaptativa (He *et al.*, 2022). O tratamento com WM não apresentou aumento significativo nos níveis de IFN- γ , mostrando que o efeito parcial sobre a proliferação e o crescimento do melanoma B16-F10 se deu por outras vias, como possivelmente a ação do IFN tipo I, uma vez que foi observada a maior expressão gênica de *Ifnb1* nos animais tratados pela via oral com WM. *In vivo*, a administração oral de uma (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucana extraída da parede celular de *S. cerevisiae* em camundongos com tumores sólidos induziu uma conversão significativa dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) do fenótipo M2 imunossupressor para um fenótipo M1 pró-inflamatório e antitumoral, evidenciada pelo aumento da expressão de citocinas inflamatórias, como IL-12, TNF- α e IL-6, e pela redução de mediadores típicos do fenótipo M2, como IL-10 e arginase-1. Concomitantemente, observou-se uma intensificação da ativação de células T efectoras, marcada pela elevação da produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no microambiente tumoral (Liu *et al.*, 2015). No tempo avaliado (17 dias) os tratamentos realizados não mostraram alterações significativas na expressão de genes relacionados aos fenótipos M1 e M2 de macrófagos.

A literatura descreve que as (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucanas podem se ligar a vários PRRs e ativar vias de sinalização inflamatórias, induzindo uma resposta imunológica (Brown; Gordon, 2005). A análise do crescimento tumoral em camundongos deficientes para o receptor TLR2 demonstrou que, nos animais

tratados com a (1→3)(1→6)-β-D-glucana BOT por via oral, o padrão de crescimento e o volume tumoral foram semelhantes ao observado nos animais WT, embora as diferenças não tenham alcançado significância estatística. Esses dados sugerem que a ausência específica do TLR2 pode não comprometer os efeitos antitumorais da BOT, possivelmente em razão de sua capacidade de interagir com múltiplos receptores expressos por células do sistema imune, além do TLR2. No entanto, é importante ressaltar que esses resultados ainda precisam ser repetidos e confirmados, uma vez que os receptores envolvidos podem estar atuando de forma sinérgica, o que pode mascarar efeitos individuais. Ao avaliarmos o mesmo modelo em camundongos deficientes para o receptor TLR4, observou-se um fenótipo mais proeminente do envolvimento desses receptores no controle tumoral. Os camundongos tratados com BOT oral não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle, como observado nos animais WT, sugerindo que os efeitos antitumorais dessa molécula são, ao menos em parte, dependentes da presença funcional desse receptor. O receptor TLR4 é amplamente reconhecido por seu papel na ativação da resposta imune, sendo capaz de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, bem como certos carboidratos complexos como as (1→3)(1→6)-β-D-glucanas. Sua ativação leva à sinalização através de duas vias principais: MyD88 e TRIF. Ambas culminam na ativação de fatores de transcrição como NF-κB e IRFs, com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo I, como IFN-β (Akira *et al.*, 2006; Savitsky *et al.*, 2010). Estudos anteriores demonstram que a ativação do TLR4, de forma indireta, também pode induzir a produção de IFN-γ, outra citocina fundamental para a resposta imune adaptativa, especialmente no contexto antitumoral (Matsuura *et al.*, 2003). A produção dessa citocina é essencial para a ativação de macrófagos e células T CD8⁺, favorecendo a polarização de macrófagos para o fenótipo M1 e promovendo uma resposta citotóxica contra células tumorais. Além disso, outros trabalhos indicam o papel central do TLR4 na mediação da resposta imune antitumoral por meio da indução de IFN-γ e outras citocinas inflamatórias (Sahasrabudhe *et al.*, 2016; Vitiello *et al.*, 2021).

Os animais TLR4^{-/-} tratados com a (1→3)(1→6)-β-D-glucana WM oral apresentaram aumento significativo no peso tumoral ao final do tempo experimental. Nossos achados indicam que esse receptor desempenha um papel essencial no controle do crescimento tumoral mediado pela administração da WM, particularmente por meio da ativação da via TRIF. Essa hipótese é sustentada pela observação de um aumento significativo na expressão gênica de IFN-β em camundongos WT, citocina característica da via TRIF, cuja produção é induzida pela ativação de fatores de transcrição como IRF3 e NF-κB (Han *et al.*, 2004). No entanto, embora o IFN-β possa estar envolvido na discreta, porém não significativa, redução tumoral observada com a administração oral da WM, sua contribuição direta ainda não pode ser confirmada. Uma abordagem futura possível seria o uso de camundongos IFNAR^{-/-}, o que poderia esclarecer se a ausência dessa via resulta em um fenótipo semelhante ao observado com a WM oral, caracterizado pelo aumento do crescimento tumoral. A via TRIF é conhecida por ativar a produção de interferons tipo I, como IFN-β, que desempenham um papel crucial na modulação da resposta inflamatória. No contexto tumoral, a produção de IFN-β pode influenciar o microambiente tumoral, promovendo resposta imune antitumoral (Gellert *et al.*, 2024). A ausência de TLR4 pode impedir a ativação dessa via, resultando na falta de IFN-β e no crescimento exacerbado tumoral comparado aos animais do grupo controle.

Estudos utilizando a (1→3)(1→6)-β-D-glucana particulada Zimozan - obtida de *S. cerevisiae* - e a (1→3)(1→6)-β-D-glucana solúvel Laminarina - obtida da alga *Laminaria digitata* - Kanjan e colaboradores (2017) mostraram que *in vitro* seus efeitos imunomoduladores dependem da interação combinada entre Dectin-1 e TLR2, TLR4 e TLR5, sendo influenciados pela forma (particulada ou solúvel) e pela variante do receptor Dectin-1. TLR2 e TLR4, em particular, regulam negativamente a ativação do Dectin-1, enquanto TLR5 não exerce papel relevante nesse contexto. A laminarina demonstrou efeitos imunomoduladores dependentes da coexpressão de Dectin-1A com TLR4. Sua solubilidade e estrutura limitaram a intensidade da resposta imune em comparação com o Zimozan, destacando a importância da forma física e das interações receptoras

na modulação da inflamação. Sabe-se que no câncer, a inflamação desempenha um papel ambivalente, dependendo do contexto. Enquanto respostas inflamatórias agudas podem contribuir para a eliminação de células tumorais, a inflamação sustentada (crônica) pode promover a progressão tumoral por ativar vias pró-oncogênicas, dano ao DNA com consequente instabilidade genômica, bem como a promoção da angiogênese (Zhao *et al.*, 2021; Greten; Grivennikov, 2019). A avaliação temporal dos produtos de ativação da resposta imune pelos tratamentos com a BOT e a WM nos animais WT, bem como o melhor entendimento desses mediadores inflamatórios nos animais deficientes para receptores TLR e para Dectin são necessários para a melhor compreensão da interação entre esses receptores e o papel da resposta inflamatória exercida pelas (1→3)(1→6)-β-D-glucanas na terapia antitumoral.

Por fim, nos tratamentos por via oral realizados com camundongos IFN-γ^{-/-} não foram observadas diferenças significativas no peso tumoral e nem no índice mitótico em comparação ao grupo controle, sugerindo que a produção de IFN-γ, observada também pelo aumento dessa citocina no tecido tumoral detectada pelas análises de CBA, é um componente essencial para a mediação dos efeitos antitumorais observados, principalmente para a BOT oral. Esses achados estão em concordância com estudos que destacam o papel central do IFN-γ na imunidade antitumoral, especialmente por sua capacidade citostática sobre células tumorais (Chen; Niu; Xue, 2023). Em conjunto, os nossos resultados indicam que o efeito antitumoral das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas depende tanto da via de administração quanto da fonte de obtenção, sugerindo a BOT oral como a mais eficaz, sendo a sua ação dependente da ativação de receptores da imunidade inata (TLR2 e TLR4) e também da produção de citocinas inflamatórias, como IFN- γ, para exercer o seu potencial protetor na terapia antitumoral.

8. CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que a administração oral da (1→3)(1→6)-β-D-glucana Botriosferana promoveu uma redução significativa no volume e no peso tumoral nos camundongos C57BL/6 WT portadores de melanoma B16-F10 subcutâneo. Tal efeito não foi observado quando a Botriosferana foi administrada por via intraperitoneal, o que sugere que sua eficácia antitumoral está associada à passagem da substância pelo trato gastrointestinal. Entretanto, mais investigações são necessárias para elucidar melhor esse mecanismo. Os dados obtidos indicam que, ao menos em parte, essa (1→3)(1→6)-β-D-glucana exerce sua atividade antitumoral por meio da modulação da resposta imune, especialmente pela ativação das vias de sinalização mediadas por receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) e a produção de IFN-γ. Esses achados reforçam o potencial imunomodulador dessa (1→3)(1→6)-β-D-glucana e destacam a importância da ativação de vias específicas do sistema imune inato e adaptativo no controle do crescimento tumoral. Por sua vez, a (1→3)(1→6)-β-D-glucana Wellmune não apresentou efeito significativo no controle tumoral em animais WT e teve o crescimento dos tumores aumentado na ausência do receptor TLR4. Esse receptor é necessário para a produção de IFN-β, cujo a expressão gênica mostrou-se aumentada no grupo Wellmune oral em camundongos WT. Dessa forma, a via de TLR4 parece ser crucial para o controle do crescimento tumoral nos animais tratados com WM. A avaliação de outras vias do sistema imune e do efeito dos tratamentos sobre a sobrevivência das células de melanoma são cruciais para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos. A pesquisa sobre o potencial antitumoral das (1→3)(1→6)-β-D-glucanas abre caminhos promissores para seu uso em combinação com outros tratamentos sistêmicos para o melanoma, como a dacarbazina e os inibidores de *checkpoint* imunológico.

REFERÊNCIAS

AIMANIANDA, Vishukumar; CLAVAUD, Cécile; SIMENEL, Catherine; FONTAINE, Thierry; DELEPIERRE, Muriel; LATGÉ, Jean-Paul. Cell wall beta-(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13401–13412, 15 maio 2009. DOI: 10.1074/jbc.M807667200.

AKRAMIENE, D.; Paliulionis, M.; Vetvicka, V.; Vetvickova, J. The effects of β -glucans on immune system and cancer. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–13, 2007.

ANDERSON, Michael J.; SHAFER-WEAVER, Kimberly; GREENBERG, Norman M.; *et al.* Tolerization of Tumor-Specific T Cells Despite Efficient Initial Priming in a Primary Murine Model of Prostate Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 3, p. 1268–1276, 2007.

BALCH, Charles M.; SOONG, Seng-Jaw; ATKINS, Michael B.; BUZAID, Antonio C.; CASCINELLI, Natale; COIT, Daniel G.; FLEMING, Irvin D.; GERSHENWALD, Jeffrey E.; HOUGHTON, Alan Jr.; KIRKWOOD, John M.; McMASTERS, Kelly M.; MIHM, Martin F.; MORTON, Donald L.; REINTGEN, Douglas S.; ROSS, Merrick I.; SOBER, Arthur; THOMPSON, John A.; THOMPSON, John F. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 54, n. 3, p. 131–149, 2004. DOI: 10.3322/canjclin.54.3.131.

BALKWILL, Fran; MANTOVANI, Alberto. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539–545, 2001.

BALLANTYNE, Anita D.; GARNOCK-JONES, Karly P. Dabrafenib: First Global Approval. **Drugs**, v. 73, n. 12, p. 1367–1376, 2013.

BARAN J, Allendorf DJ, Hong F, Ross GD. Oral beta-glucan adjuvant therapy converts nonprotective Th2 response to protective Th1 cell-mediated immune response in mammary tumor-bearing mice. *Folia histochemica et cytobiologica*. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 45, n. 2, p. 107–114, 2007.

BARTON, Gregory M; KAGAN, Jonathan C; MEDZHITOV, Ruslan. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. **Nature Immunology**, v. 7, n. 1, p. 49–56, 2005.

BECKER, Jürgen C.; HOUBEN, Roland; SCHRAMA, David; VOIGT, Heike; UGUREL, Selma; REISFELD, Ralph A. Mouse models for melanoma: a personal perspective. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 2, p. 157–164, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.00986.x.

BEMELMANS, M. H. A.; VAN TITS, L. J. H.; BUURMAN, W. A. Tumor Necrosis Factor: Function, Release and Clearance. **Critical Reviews in Immunology**, v. 37, n. 2–6, p. 249–259, 2017.

BOSE, Nandita; WURST, Lindsay R.; CHAN, Anissa S. H.; DUDNEY, Christine M.; LEROUX, Megan L.; DANIELSON, Michael E.; WILL, Paul M.; NODLAND, Sonja E.; PATCHEN, Myra L.; DALLE LUCCA, Jurandir J.; LEBEDA, Frank J.; VASILAKOS, John P. Differential regulation of oxidative burst by distinct β -glucan-binding receptors and signaling pathways in human peripheral blood mononuclear cells. **Glycobiology**, v. 24, n. 4, p. 379–391, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu005>.

BOUTROS, Jean A.; MAGEE, Andrew S.; COX, Donald. Comparison of structural differences between yeast β -glucan sourced from different strains of *saccharomyces cerevisiae* and processed using proprietary manufacturing processes. **Food Chemistry**, v. 367, p. 130708, 2022.

BROWN, Gordon D.; GORDON, Siamon. A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36–37, 2001.

BROWN, Gordon D.; GORDON, Siamon. Immune recognition of fungal β -glucans. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 471–479, 2005.

BROWN, Gordon D.; HERRE, Jurgen; WILLIAMS, David L.; LOPER, Richard; CORDOBA, Stefan; KAHANA, Margo; SLOBODKIN, Linda. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119–1124, 2003. DOI: 10.1084/jem.20030172.

BUDAK, Ferah; GÖRAL, Güher; ORAL, Haluk Barbaros. *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan induces interferon-gamma production in human T cells via IL-12, 13. **Immunology Letters**, v. 121, p. 21-26, 2008.

BURKE, J. Daniel; YOUNG, Howard A. IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place. **Seminars in Immunology**, v. 43, p. 101280, 2019.

CHAN, Godfrey Chi-Fung; CHAN, Wing Keung; SZE, Daniel Man-Yuen. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 2, n. 25, 2009. DOI: 10.1186/1756-8722-2-25.

CHAN, Godfrey Chi-Fung; CHAN, Wing Keung; SZE, Daniel Man-Yuen. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 2, n. 1, 2009.

CHAN, K.; LEE, J.; PANG, M. β -glucans and macrophage activation: a novel approach to cancer therapy. **Cancer Research**, v. 72, n. 2, p. 423–432, 2011. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2960.

CHEN, Daniel S.; MELLMAN, Ira. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1–10, 2013.

CHEN, Jun; WANG, Xin; LIU, Zhiwei; XU, Pei; LI, Ming; YU, Shijie; LIU, Ying. Dual role of IL-6 in tumor progression and response to therapy. **Cancer Immunology**, v. 68, n. 4, p. 445–452, 2019. DOI: 10.1016/j.canimm.2019.04.003.

CIRILLO, Nicola. Global epidemiological trends in the incidence and mortality for melanoma. **Skin Health and Disease**, v. 5, n. 1, p. 84–86, 2025.

COMIRAN, Patrícia K.; RIBEIRO, Mariana C.; SILVA, John H. G.; FERRAZ, Débora L. C.; ALVES, Cristiano S.; SOUZA, Rafael F.; MOURA, Eduardo R. F.; LIMA, Raquel R. Botryosphaeran Attenuates Tumor Development and the Cancer Cachexia Syndrome in Walker-256 Tumor-Bearing Obese Rats and Improves the Metabolic and Hematological Profiles of These Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 73, n. 7, p. 1175–1192, 2020. DOI: 10.1080/01635581.2020.1762598.

CONDEELIS, John; POLLARD, Jeffrey W. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263–266, 2006.

CORTEZ, Jose L.; VASQUEZ, Juan; WEI, Maria L. The impact of demographics, socioeconomics, and health care access on melanoma outcomes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 84, n. 6, p. 1677–1683, 2021.

CURTI, Brendan D.; FARIES, Mark B. Recent Advances in the Treatment of Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 23, p. 2229–2240, 2021.

DA VEIGA, Cassia Rita Pereira; DA VEIGA, Claudimar Pereira; SOUZA, Alceu. Cutaneous melanoma: cost of illness under Brazilian health system perspectives. **BMC Health Services Research**, v. 21, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/s12913-021-06232-3.

DAVAR, Diwakar; DING, Fei; SAUL, Melissa; QIU, Jie; O'NEIL, Brian H.; LE, Shaojuan; MA, Ling; PAL, Shivendra; ZHANG, Yun; ZHANG, Guoyu. High-dose interleukin-2 (HD IL-2) for advanced melanoma: a single center experience from the University of Pittsburgh Cancer Institute. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 5, n. 1, 2017. DOI: 10.1186/s40425-017-0255-4.

DE MARCO CASTRO, Elena; CALDER, Philip C.; ROCHE, Helen M. β -1,3/1,6-Glucans and Immunity: State of the Art and Future Directions. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 65, n. 1, 2020.

DE VISSER, Karin E.; EICHTEN, Alexandra; COUSSENS, Lisa M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24–37, 2006.

DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA-DEKKER, Aneli M. Botryosphaeran. *In*: **Polysaccharides of Microbial Origin**. Cham: Springer International Publishing, 2021, p. 1–17.

DEKKER, Robert F. H.; QUEIROZ, Eveline A. I. F.; CUNHA, Mario A. A.; MORO, Péricles L. P.; RIBEIRO, Alexandre D. P.; FERREIRA, Luiz F. A. Botryosphaeran – A fungal exopolysaccharide of the (1→3)(1→6)- β -D-glucan kind: structure and biological functions. *In*: **Biologically-Inspired Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 433–484.

DENG, Chao; FU, Haitian; SHANG, Jingying; LIU, Xue; CHEN, Bo; ZHANG, Chaoqun. Dectin-1 mediates the immunoenhancement effect of the polysaccharide from *Dictyophora indusiata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 369–374, 2018.

DHANYAMRAJU, Pavan Kumar; PATEL, Trupti N. Melanoma therapeutics: a literature review. **The Journal of Biomedical Research**, v. 36, n. 2, p. 77, 2022.

DING, Chuanlin; SHRESTHA, Rejeena; ZHU, Xiaojuan; *et al.* Inducing trained immunity in pro-metastatic macrophages to control tumor metastasis. **Nature Immunology**, v. 24, n. 2, p. 239–254, 2023.

DOMINGUES, Beatriz; LOPES, Jose; SOARES, Paula; MENDES, Gabriel. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 7, p. 35–49, 2018.

DRANOFF, Glenn. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 11–22, 2004.

DU, Bin; MEENU, Maninder; LIU, Hongzhi; ZHAO, Hongyan; LI, Yanjun; LIU, Qing; ZHANG, Yan. A concise review on the molecular structure and function relationship of β -glucan. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, 2019.

DUNN, Gavin P.; KOEBEL, Catherine M.; SCHREIBER, Robert D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 11, p. 836–848, 2006.

DUPAGE, Michel; JACKS, Tyler. Genetically engineered mouse models of cancer reveal new insights about the antitumor immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 192–199, 2013.

EGEN, Jackson G.; OUYANG, Wenjun; WU, Lawren C. Human Anti-tumor Immunity: Insights from Immunotherapy Clinical Trials. **Immunity**, v. 52, n. 1, p. 36–54, 2020.

EGGERMONT, Alexander M.M.; SUCIU, Stefan; TESTORI, Alessandro. Long-Term Results of the Randomized Phase III Trial EORTC 18991 of Adjuvant Therapy With Pegylated Interferon Alfa-2b Versus Observation in Resected Stage III Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 31, p. 3810–3818, 2012.

FAGNONI, F. F.; MORAES, L. R.; CUNHA, L. D.; MELO, R. C.; SILVA, G. F.; BERMUDEZ, J. E.; CASTRO, M. A. R. The interleukin-2 receptor and its role in immune response. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 2963–2971, 2004.

FERREIRA, Sónia S.; PASSOS, Cláudia P.; MADUREIRA, Pedro; FERNANDES, Carlos; PEREIRA, Luísa; FONSECA, Sónia C.; CASTRO, Isilda. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 378–396, 2015..

FLAHERTY, Keith T.; INFANTE, Jeffery R.; DAUD, Adil; GROVE, David; SMITH, David; MASON, Wade; LUDVIGSEN, Stine; MATHESON, Daniel; BAKOS, Heather; HEATH, Elizabeth; SCHNEIDER, Jean; SCHWEIZER, Martin; ORTIZ, Pedro; ROSENBERG, Jeffrey E.; WOLCHOK, Jedd D.; HODGKINSON, Michael. Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 18, p. 1694–1703, 2012.

FOWLKES, Natalie; CLEMONS, Kelli; RIDER, Paul J. F.; KRONTZ, Sheree; MCDONALD, Brandy; CALLOWAY, Tamika; BAILEY, Tiffani; HERBERT, Donna; LARSON, Dana; EBERLE, Lauren. Factors Affecting Growth Kinetics and Spontaneous Metastasis in the B16F10 Syngeneic Murine Melanoma Model. **Comparative Medicine**, v. 69, n. 1, p. 48–54, 2019.

FRIDLENDER, Zvi G.; SUN, Jing; KIM, Samuel; FENG, Yan; SHEN, Yu; CHENG, Guang; AMIRI, Kambiz I.; POLI, Mark A.; SINGH, Ruchika; GRANT, Eric; WOOD, Tharon E.; KROGH, Douglas C.; VILLENUEVE, Carole; WANG, Lin; FERGUSON, Scott; DUNN, Jennifer M.; DEININGER, Matthew W.; DAVIDSON, Shannon R.; NAHLEH, Ziad; NAHLEH, Ziad; KNEPPER, Kelly A.; ZABORINA, Oleg; PENG, Xinghua. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183–194, 2009.

FULLER, Richard; BUTT, Hamza; NOAKES, Paul S.; HAWKEY, C.; TEODORO, R.; LEVY, J.; WINTER, J.; JONES, C. Influence of yeast-derived 1,3/1,6 glucopolysaccharide on circulating cytokines and chemokines with respect to upper respiratory tract infections. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 665–669, 2012.

FULLER, Richard; MOORE, Michael V.; LEWITH, George; RAY, Jennifer L.; WALTERS, Stephen D.; RYAN, William; GAVIN, Michael; GILLET, Sandi. Yeast-derived β -1,3/1,6 glucan, upper respiratory tract infection and innate immunity in older adults. **Nutrition**, v. 39–40, p. 30–35, 2017.

GANTNER, Benjamin N.; SIMMONS, Randi M.; CANAVERA, Scott J.; HAYNES, M. Naomi; UNDERHILL, David M. Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1107–1117, 2003.

GARBE, Claus; KRASAGAKIS, Konstantin. Effects of Interferons and Cytokines on Melanoma Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, n. 2, p. S239–S244, 1993.

GAST, Charles E.; SILK, Alain D.; ZAROOR, Luai; WEINBERG, Rachel A.; VASILENKO, Yulia; DONALDSON, Maria; BOON, Janine; VAN DOORN, Renske; DIJKGRAAF, Ingrid; GEORGE, Andrew; SIMPSON, Ivan; MCGREGOR, Samuel; DOERING, Stephanie; DE HEER, Timo; FROST, David; JONKER, David; WETZEL, Annelies; AGLIETTI, Charles; BONETTI, Annamaria; Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival. **Science Advances**, v. 4, n. 9, 2018.

GERALDELLI, Danielli; RIBEIRO, Mariana C.; MEDEIROS, Túlio C.; MORAES, José A.; SANTOS, Camila M.; CAMPOS, Mariana M.; CASTRO, Thais A.; PEREIRA, Luis D.; ALMEIDA, Mariana C.; SILVA, Aline R.; PEREIRA, Patrícia K.; et al. Tumor development in rats and cancer cachexia are reduced by treatment

with botryosphaeran by increasing apoptosis and improving the metabolic profile. **Life Sciences**, v. 252, p. 117608, 2020..

GOODRIDGE, H. S.; REYES, C. N.; BECKER, C. A.; KATSUMOTO, T. R.; MA, J.; WOLF, A. J.; BOSE, N.; CHAN, A. S.; MAGEE, A. S.; DANIELSON, M. E.; WEISS, A.; VASILAKOS, J. P.; UNDERHILL, D. M. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. **Nature**, Londres, v. 472, n. 7344, p. 471-475, 28 abr. 2011. DOI: 10.1038/nature10071.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. β -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, Hoboken, v. 230, p. 38-50, jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x>.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GRÜNEBACH, F.; WECK, M. M.; REICHERT, J.; BROSSART, P. Molecular and functional characterization of human Dectin-1. **Experimental Hematology**, New York, v. 30, n. 11, p. 1309–1315, nov. 2002. DOI: 10.1016/S0301-472X(02)00928-1.

HAANEN, John B.A.G. Immunotherapy of melanoma. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 11, n. 2, p. 97–105, 2013.

HAN, Biao; BARUAH, Sri Kartik; COX, Eric; VANROMPAY, Daisy; BOSSIER, Peter. Structure-functional activity relationship of β -glucans from the perspective of immunomodulation: a mini-review. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, art. 658, p. 1–8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00658>.

HEDRICH, Christian M.; BREAM, Jay H. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1–3, p. 185–206, 2010.

HEMMI, Hiroaki; AKIRA, Shizuo. TLR Signalling and the Function of Dendritic Cells. *In: Chemical Immunology and Allergy*. Basel: KARGER, 2005, p. 120–135. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000086657>>. Acesso em: 9 May 2025.

HERRE, J. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p. 869–876, 2004.

HERTZMAN JOHANSSON, Carolina; EGYHAZI BRAGE, Suzanne. BRAF inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, n. 2, p. 176–182, 2014.

HURST, Jillian H. Cancer immunotherapy innovator James Allison receives the 2015 Lasker~DeBakey Clinical Medical Research Award. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 10, p. 3732–3736, 2015.

IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 95-109, abr. 2002. DOI: 10.1016/s1359-6101(01)00038-7.

INA, Kenji. Lentinan prolonged survival in patients with gastric cancer receiving S-1-based chemotherapy. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 2, n. 10, p. 339, 2011.

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 987–995, 2004.

JAVMEN, A.; NEMEIKAITĖ-ČĖNIENĖ, A.; BRATCHIKOV, M.; GRIGIŠKIS, S.; GRIGAS, F.; JONAUSKIENĖ, I.; ZABULYTĖ, D.; MAURICAS, M. β -Glucan from

Saccharomyces cerevisiae induces IFN- γ production in vivo in BALB/c mice. **In Vivo**, Atherton, v. 29, n. 3, p. 359–363, maio-jun. 2015.

JEDINAK, A.; SLIVA, D. Pleurotus ostreatus inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 6, p. 1307-1313, dez. 2008. DOI: não informado. PMID: 19020765. PMCID: PMC2796484.

JENKINS, Russell W.; FISHER, David E. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 1, p. 23–31, 2021.

JIANG, Tao; ZHOU, Caicun; REN, Shengxiang. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. **Oncolimmunology**, v. 5, n. 6, p. e1163462, 2016.

JIN, Yiming; LI, Pingli; WANG, Fengshan. β -glucans as potential immunoadjuvants: A review on the adjuvant activity, structure-activity relationship and receptor recognition properties. **Vaccine**, v. 36, n. 35, p. 5235–5244, 2018.

JORGOVANOVIC, D.; SONG, M.; WANG, L.; ZHANG, Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. **Biomarker Research**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 49, 2020. DOI: 10.1186/s40364-020-00228-x.

KAWAKAMI, Koji; PURI, Raj K. Interleukin-4/13 and Cancer. *In*: **Cancer Drug Discovery and Development**. Totowa, NJ: Humana Press, [s.d.], p. 135–153. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-455-1_7>. Acesso em: 9 May 2025.

KIM, C.; LEE, C. W.; KOVACIC, L.; SHAH, A.; KLASA, R.; SAVAGE, K. J. Long-term survival in patients with metastatic melanoma treated with DTIC or temozolomide. **The Oncologist**, v. 15, n. 7, p. 765–771, 2010. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0237.

KIM, H. S.; HONG, J. T.; KIM, Y.; HAN, S. B. Stimulatory effect of β -glucans on immune cells. **Immune Network**, v. 11, n. 4, p. 191–195, ago. 2011. DOI: 10.4110/in.2011.11.4.191.

KIM, Ryungsa; EMI, Manabu; TANABE, Kazuaki. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, v. 121, n. 1, p. 1–14, 2007.

Kim, Wan-Jae & Yoon, Taek & Kim, Dong-Woo & Moon, Won-Kook & Lee, Kwang Ho. (2010). Immunostimulating Activity of Beta-Glucan Isolated from the Cell Wall of Mutant *Saccharomyces cerevisiae*, and Its Anti-Tumor Application in Combination with Cisplatin. *The Korean Journal of Food And Nutrition*. 23.

KIMURA, Yoshiyuki; SUMIYOSHI, Maho; SUZUKI, Toshio; SAKANAKA, Masahiro. Antitumor and antimetastatic activity of a novel water-soluble low molecular weight beta-1,3-D-glucan (branch beta-1,6) isolated from *Aureobasidium pullulans* 1A1 strain black yeast. **Anticancer Research**, Atenas, v. 26, n. 6, p. 4131–4141, 2006.

KUMARI, Neeraj; DWARAKANATH, B. S.; DAS, Asmita; BHATT, Anant Narayan. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **Tumour Biology**, [S.l.], v. 37, n. 9, p. 11553–11572, 2016. DOI: 10.1007/s13277-016-5098-7

KUO, Mei-Chun; CHANG, Chien-Yu; CHENG, Tso-Lin; WU, Ming-Jiuan. Immunomodulatory effect of exo-polysaccharides from submerged cultured *Cordyceps sinensis*: enhancement of cytokine synthesis, CD11b expression, and phagocytosis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 75, p. 769–775, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-0880-5. SpringerLink +6

KUZU, Omer F.; NGUYEN, Felix D.; NOORY, Mohammad A.; SHARMA, Arati. Current state of animal (mouse) modeling in melanoma research. **Cancer Growth and Metastasis**, [S.l.], v. 8, suppl. 1, p. 81–94, 2015. DOI: 10.4137/CGM.S21214.

LANGOWSKI, John L.; KASTELEIN, Robert A.; OFT, Martin. Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 5, p. 207–212, 2007.

LARKIN, James; CHIARION-SILENI, Vanna; GONZALEZ, Rene; GROB, Jean-Jacques; RUTKOWSKI, Piotr; LAO, Christopher D.; COWEY, C. Lance; SCHADENDORF, Dirk; WAGSTAFF, James; DUMMER, Reinhard; FERRUCCI, Pier Francesco; SMYLIE, Michael; HILL, Andrew; HOGG, David; MARQUEZ-RODAS, Ignacio; JIANG, Jian; RIZZO, John; LARKIN, James; WOLCHOK, Jedd D. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. **The New England Journal of Medicine**, [S.l.], v. 381, n. 16, p. 1535–1546, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1910836.

LEE, Ho. Genetically Engineered Mouse Models for Drug Development and Preclinical Trials. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 22, n. 4, p. 267–274, 2014.

LI, Cang; KUAI, Le; CUI, Rutao; MIAO, Xiao. Melanogenesis and the targeted therapy of melanoma. **Biomolecules**, [S.l.], v. 12, n. 12, p. 1874, 2022. DOI: 10.3390/biom12121874.

LIN, Wan-Wan; KARIN, Michael. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175–1183, 2007.

LIU, Victoria C.; WONG, Larry Y.; JANG, Thomas; SHAH, Ali H.; PARK, Irwin; YANG, Ximing; ZHANG, Qiang; LONNING, Scott; TEICHER, Beverly A.; LEE,

Chung. Tumor evasion of the immune system by converting CD4⁺CD25⁻ T cells into CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 2883–2892, 2007. DOI: 10.4049/jimmunol.178.5.2883.

LONG, Georgina V.; SWETTER, Susan M.; MENZIES, Alexander M.; GERSHENWALD, Jeffrey E.; SCOLYER, Richard A. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, [S.l.], v. 402, n. 10303, p. 1–18, 2023. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00821-8.

MACHIRAJU, Devayani; WIECKEN, Melanie; LANG, Nina; HÜLSMEYER, Ingrid; ROTH, Jasmin; SCHANK, Timo E.; EURICH, Rosa; HALAMA, Niels; ENK, Alexander; HASSEL, Jessica C. Soluble immune checkpoints and T-cell subsets in blood as biomarkers for resistance to immunotherapy in melanoma patients. **OncolImmunology**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 1926762, 2021. DOI: 10.1080/2162402X.2021.1926762.

MAGNANI, Marciane; CASTRO-GÓMEZ, Raul Jorge Hernan. Beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631, 2008.

MAL, Xiaojing; TRINCHIERI, Giorgio. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *In: Advances in Immunology*. [s.l.]: Elsevier, 2001, p. 55–92. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(01\)79002-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(01)79002-5)>. Acesso em: 9 May 2025.

MANNINO, Michael H.; ZHU, Zhen; XIAO, Hong; BAI, Qing; WAKEFIELD, Michael R.; FANG, Yi. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, [S.l.], v. 367, n. 2, p. 103–107, 2015. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.009.

MANTOVANI, Alberto; ALLAVENA, Paola; SICA, Antonio; BALKWILL, Frances. Cancer-related inflammation. **Nature**, [S.l.], v. 454, n. 7203, p. 436–444, 2008. DOI: 10.1038/nature07205.

MAYNARD, Craig L.; WEAVER, Casey T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 219–233, 2008.

MCKINNEY, Andrea J.; HOLMEN, Sheri L. Animal models of melanoma: a somatic cell gene delivery mouse model allows rapid evaluation of genes implicated in human melanoma. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 3, p. 153–162, 2011.

MIRLEKAR, Bhalchandra; PYLAYEVA-GUPTA, Yuliya. IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. **Cancers**, v. 13, n. 2, p. 167, 2021.

MISHRA, Vartika; TRIPATHI, Vachaspati; YADAV, Priyanka; SINGH, M. P. Beta glucan as an immune stimulant in tumor microenvironment – Insight into lessons and promises from past decade. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 234, p. 123617, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123617.

MO, Li; CHEN, Yafei; LI, Wenjian; GUO, Shuai; WANG, Xuzhao; AN, Hailong; ZHAN, Yong. Anti-tumor effects of (1→3)-β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* in S180 tumor-bearing mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 385–392, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.106.

MOGENSEN, Trine H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses - PMC. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, .

MORVAN, Maelig G.; LANIER, Lewis L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 7–19, 2015.

MOTZ, Greg T.; COUKOS, George. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 61–73, 2013.

MUELLER, Antje; RAPTIS, John; RICE, Peter J.; KALBFLEISCH, John H.; STOUT, Robert D.; ENSLEY, Harry E.; BROWDER, William; WILLIAMS, David L. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1->3)-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. **Glycobiology**, v. 10, n. 4, p. 339–346, 2000.

NOSS, I.; DOEKES, G.; THORNE, P. S.; HEEDERIK, D. J.; WOUTERS, I. M. Comparison of the potency of a variety of β -glucans to induce cytokine production in human whole blood. **Innate Immunity**, v. 19, n. 1, p. 10–19, 2012.

OLBRYT, Magdalena; RAJCZYKOWSKI, Marcin; WIDŁAK, Wiesława. Biological Factors behind Melanoma Response to Immune Checkpoint Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4071, 2020.

OSSIO, Raul; ROLDÁN-MARÍN, Rodrigo; MARTÍNEZ-SAID, Héctor; ADAMS, David J.; ROBLES-ESPINOZA, Carla D. Melanoma: a global perspective. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 7, p. 393–394, 2017.

PANSY, K.; UHL, B.; KRSTIC, J.; SZMYRA, M.; FECHTER, K.; SANTISO, A.; THÜMINGER, L.; GREINIX, H.; KARGL, J.; PROCHAZKA, K.; FEICHTINGER, J.; DEUTSCH, A. J. Immune Regulatory Processes of the Tumor Microenvironment under Malignant Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13311, 2021.

PANTALEÃO, Claudia; LUCHS, Adriana. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 439–445, 2010.

PARKER, Belinda S.; RAUTELA, Jai; HERTZOG, Paul J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 3, p. 131–144, 2016.

PAUL, William E.; ZHU, Jinfang. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225–235, 2010.

PIMENTA, José; PRADA, Justina; COTOVIO, Mário. Equine Melanocytic Tumors: A Narrative Review. **Animals**, v. 13, n. 2, p. 247, 2023.

POLTON, Gerry; BORREGO, Juan F.; CLEMENTE-VICARIO, Francisco; CLIFFORD, Craig A.; JAGIELSKI, Dariusz; KESSLER, Martin; KOBAYASHI, Tetsuya; LANORE, Didier; QUEIROGA, Felisbina L.; TRANAEUS ROWE, Annika; VAJDOVICH, Péter; BERGMAN, Philip J. Melanoma of the dog and cat: consensus and guidelines. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, 2024.

POSTE, G.; DOLL, J.; BROWN, A. E.; TZENG, J.; ZEIDMAN, I. Comparison of the metastatic properties of B16 melanoma clones isolated from cultured cell lines, subcutaneous tumors, and individual lung metastases. . **Cancer research**, v. 42, n. 7, p. 2770, 1982.

POULIKAKOS, P. I.; ZHANG, C.; BOLLAG, G.; SHOKAT, K. M.; ROSEN, N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 427–430, 2010.

RABINOVICH, Gabriel A.; GABRILOVICH, Dmitry; SOTOMAYOR, Eduardo M. Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 267–296, 2007.

RAO, X.; HUANG, X.; ZHOU, Z.; LIN, X. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis - PMC. **Biostatistics, bioinformatics and biomathematics**, v. 3, n. 3, .

RICHMOND, Ann; SU, Yingjun. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. **Disease Models & Mechanisms**, v. 1, n. 2–3, p. 78–82, 2008.

ROBERT, Caroline; GROB, Jean-Jacques; STROYAKOVSKIY, Dmitry; KARASZEWSKA, Beata; HAUSCHILD, Axel; LEVCHENKO, Evgeny; CHIARION SILENI, Vittorio; SCHACHTER, Jacob; GARBE, Claus; BONDARENKO, Igor; GOGAS, Helen; MANDALÁ, Mario; HAANEN, John B. A. G.; LEBBÉ, Christian; MACKIEWICZ, Andrzej; RUTKOWSKI, Piotr; NATHAN, Paul D.; RIBAS, Antoni; DAVIES, Mark A.; FLAHERTY, Keith T.; BURGESS, Barbara; TAN, Michelle; GASAL, Ernesto; VOI, Manlio; SCHADENDORF, Dirk; LONG, Georgina V. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 7, p. 626–636, 2019.

RYDÉN, V.; EL-NAGGAR, A. I.; KOLIADI, A.; LADJEVARDI, C. O.; DIGKAS, E.; VALACHIS, A.; ULLENHAG, G. J. The role of dacarbazine and temozolomide therapy after treatment with immune checkpoint inhibitors in malignant melanoma patients: A case series and meta-analysis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 37, n. 3, p. 352–362, 2023.

SAGINALA, K.; BARSOUK, A.; ALURU, J. S.; RAWLA, P.; BARSOUK, A. Epidemiology of Melanoma. **Medical Sciences**, v. 9, n. 4, p. 63, 2021.

SAHASRABUDHE, S. S.; GOLTZ, J. M.; KENDALL, J. S. et al. β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* induces a macrophage response that is regulated by the NF- κ B pathway. **Journal of Immunology**, v. 196, p. 1102–1110, 2016.

SANMAMED, M. F.; CHESTER, C.; MELERO, I.; KOHRT, H. Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination

with other immunotherapies. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 7, p. 1190–1198, 2016.

SAROJ, P.; VERMA, M.; JHA, K.; PAL, M. AN OVERVIEW ON IMMUNOMODULATION. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 3, n. 01, p. 7–12, 2012.

SAVOIA, P.; FAVA, P.; CASONI, F.; CREMONA, O. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1483, 2019.

SCHADENDORF, Dirk; FISHER, David E.; GARBE, Claus; GERSHENWALD, Jeffrey E.; GROB, Jean-Jacques; HALPERN, Allan; HERLYN, Meenhard; MARCHETTI, Michael A.; MCARTHUR, Grant; RIBAS, Antoni; ROESCH, Alexander; HAUSCHILD, Axel. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 1–20, 2015.

SCHADENDORF, Dirk; VAN AKKOOI, Alexander C. J.; BERKING, Carola; GRIEWANK, Klaus G.; GUTZMER, Ralf; HAUSCHILD, Axel; STANG, Andreas; ROESCH, Alexander; UGUREL, Selma. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018.

SHALINI, Konda Subramanian; YENGKHOM, Omita; SUBRAMANI, Parasuraman Aiya; *et al.* Polysaccharide fraction from the Indian mistletoe, *Dendrophthoe falcata* (L.f.) Ettingsh enhances innate immunity and disease resistance in *Oreochromis niloticus* (Linn.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 407–414, 2019.

SHARMA, Padmanee; ALLISON, James P. The future of immune checkpoint therapy. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 56–61, 2015.

SICA, Antonio; ALLAVENA, Paola; MANTOVANI, Alberto. Cancer related inflammation: The macrophage connection. **Cancer Letters**, v. 267, n. 2, p. 204–215, 2008.

SILVA, N. A.; PEREIRA, B. G.; SANTOS, J. A.; GUARNIER, F. A.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KASSUYA, C. A. L.; BERNARDES, S. S. Oral administration of botryosphaeran [(1 → 3)(1 → 6)-β-d-glucan] reduces inflammation through modulation of leukocytes and has limited effect on inflammatory nociception. **Cell Biochemistry and Function**, v. 40, n. 6, p. 578–588, 2022.

SILVA, R. L.; LOPES, A. H.; BECERRA, A.; FONSECA, M. M.; MAGANIN, A.; SARAIVA, A. L. L.; CUNHA, F. Q.; ALVES-FILHO, J. C.; ZAMBONI, D. S.; CUNHA, T. M. Molecular mechanisms of zymosan-induced inflammasome activation in macrophages. **Cellular Signalling**, v. 124, p. 111418, 2024.

SMYTH, Mark J.; DUNN, Gavin P.; SCHREIBER, Robert D. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. *In*: **Advances in Immunology**. [s.l.]: Elsevier, 2006, p. 1–50. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(06\)90001-7](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(06)90001-7)>. Acesso em: 9 May 2025.

SOLTANIAN, S.; STUYVEN, E.; COX, E.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 109–138, 2009.

SONG, Q.; XU, Y.; ZHANG, M.; WU, L.; LIU, S.; LV, Y.; HU, T.; ZHAO, J.; ZHANG, X.; XU, X.; LI, Q.; ZHOU, M.; ZHANG, X.; LU, P.; YU, G.; ZHAO, C.; YANG, J. A β-1,3/1,6-glucan enhances anti-tumor effects of PD1 antibody by reprogramming tumor microenvironment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 279, p. 134660, 2024.

STIER, Heike; EBBESKOTTE, Veronika; GRUENWALD, Joerg. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2014.

STRAUSSMAN, R.; MORIKAWA, T.; SHEE, K.; BARZILY-ROKNI, M.; QIAN, Z. R.; DU, J.; DAVIS, A.; MONGARE, M. M.; GOULD, J.; FREDERICK, D. T.; COOPER, Z. A.; CHAPMAN, P. B.; SOLIT, D. B.; RIBAS, A.; LO, R. S.; FLAHERTY, K. T.; OGINO, S.; WARGO, J. A.; GOLUB, T. R. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. **Nature**, v. 487, n. 7408, p. 500–504, 2012.

SU, F.; SONG, Q.; ZHANG, C.; XU, X.; LI, M.; YAO, D.; WU, L.; QU, X.; GUAN, H.; YU, G.; YANG, J.; ZHAO, C. A β -1,3/1,6-glucan from *Durvillaea Antarctica* inhibits tumor progression in vivo as an immune stimulator. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 114993, 2019.

SULLIVAN, R.; LORUSSO, P.; BOERNER, S.; DUMMER, R. Achievements and Challenges of Molecular Targeted Therapy in Melanoma. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 35, p. 177–186, 2015.

SZABO, S. J.; SULLIVAN, B. M.; PENG, S. L.; GLIMCHER, L. H. Molecular Mechanisms RegulatinG Th1 Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 713–758, 2003.

TALBOTT, Shawn M.; TALBOTT, Julie A. Baker's Yeast Beta-Glucan Supplement Reduces Upper Respiratory Symptoms and Improves Mood State in Stressed Women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 295–300, 2012.

TALBOTT, Shawn M.; TALBOTT, Julie A.; TALBOTT, Tracy L.; DINGLER, Elaine. Baker's Yeast Beta-Glucan Supplement Reduces Allergy Symptoms and

Improves Quality of Life in Ragweed Sufferers. **The FASEB Journal**, v. 25, n. S1, 2011.

TALBOTT, Shawn; TALBOTT, Julie; COX, Don. Beta-glucan supplement reduces upper respiratory tract infections and improves mood state in healthy stressed subjects. **The FASEB Journal**, v. 24, n. S1, 2010.

TEIXEIRA, H. C.; DA SILVA DIAS, L. .; MENÃO, T. L. .; ESTEVES DE OLIVEIRA, E. Proteínas de checkpoint imunológico como novo alvo da imunoterapia contra o câncer: revisão da literatura. **HU Revista**, v. 45, n. 3, p. 325–333, 2019.

THOMAS, Scintilla; REZOAGLI, Emanuele; ABIDIN, Ismin Zainol; MAJOR, Ian; MURRAY, Patrick; MURPHY, Emma J. β -Glucans from Yeast—Immunomodulators from Novel Waste Resources. **Applied Sciences**, v. 12, n. 10, p. 5208, 2022.

THORNTON, Jessica; CHHABRA, Gagan; SINGH, Chandra K.; GUZMÁN-PÉREZ, Glorimar; SHIRLEY, Carl A.; AHMAD, Nihal. Mechanisms of Immunotherapy Resistance in Cutaneous Melanoma: Recognizing a Shapeshifter. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022.

TRINCHIERI, Giorgio; SHER, Alan. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 179–190, 2007.

TUGUES, S.; BURKHARD, S. H.; OHS, I.; VROHLINGS, M.; NUSSBAUM, K.; VOM BERG, J.; KULIG, P.; BECHER, B. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 2, p. 237–246, 2014.

UGUREL, Selma; GUTZMER, Ralf. Melanom. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 21, n. 4, p. 343–347, 2023.

VAN HORSSSEN, Remco; TEN HAGEN, Timo L. M.; EGGERMONT, Alexander M. M. TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. **The Oncologist**, v. 11, n. 4, p. 397–408, 2006.

VANNUCCI, Luca; KRIZAN, Jiri; SIMA, Petr; STAKHEEV, Dmitry; CAJA, Fabian; RAJSIGLOVA, Lenka; HORAK, Vratislav; SAIEH, Mustafa. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 2, p. 357–364, .

VIGNALI, Dario A A; KUCHROO, Vijay K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, v. 13, n. 8, p. 722–728, 2012.

VULETIĆ, Ana M.; KONJEVIĆ, Gordana M.; LARSEN, Annette K.; BABOVIĆ, Nada L.; JURIŠIĆ, Vladimir B.; KRIVOKUĆA, Ana; MIRJAČIĆ MARTINOVIĆ, Katarina M. Interleukin-4-induced natural killer cell antitumor activity in metastatic melanoma patients. **European Cytokine Network**, v. 31, n. 3, p. 104–112, 2020.

WANG, Ao-Xue; QI, Xiao-Yi. Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. **IUBMB Life**, v. 65, n. 9, p. 748–758, 2013.

WANG, Xia; LIN, Yong. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 11, p. 1275–1288, 2008.

WANG, Xu; MONTÓYO-PUJOL, Yoel Genaro; BERMÚDEZ, Sandra; CORPAS, Gonzalo; MARTÍN, Aurelio; ALMAZÁN, Francisco; CABRERA, Teresa; LÓPEZ-NEVOT, Miguel Ángel. Serum Cytokine Profiles of Melanoma Patients and Their Association with Tumor Progression and Metastasis. **Journal of Oncology**, v. 2021, p. 6610769, 2021. DOI: 10.1155/2021/6610769.

WANG, Ying; HAN, Xue; LI, Yan Dong; WANG, Yabing; ZHAO, Shi Yang; ZHANG, Dong Jie; LU, Yu. Lentinan dose dependence between immunoprophylaxis and

promotion of the murine liver cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 56, p. 95152–95162, 2017.

WARD, William H.; LAMBRETON, Fernando; GOEL, Neha; YU, Jian Q.; FARMA, Jeffrey M. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. *In: **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy***. [s.l.]: Codon Publications, 2017, p. 79–89.

WEI Liao, Jian-Xin Lin, Warren J. Leonard. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 13–25, 2013.

WEISS, Sarah A.; WOLCHOK, Jedd D.; SZNOL, Mario. Immunotherapy of Melanoma: Facts and Hopes. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 17, p. 5191–5201, 2019.

WILLMENT, Janet A.; GORDON, Siamon; BROWN, Gordon D. Characterization of the Human β -Glucan Receptor and Its Alternatively Spliced Isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 43818–43823, 2001.

WINDER, Matthew; VIRÓS, Amaya. Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. *In: **Handbook of Experimental Pharmacology***. Cham: Springer International Publishing, 2017, p. 91–108.

WOLCHOK, J. D.; KLUGER, H.; CALLAHAN, M. K.; POSTOW, M. A.; RIZVI, N. A.; LESOKHIN, A. M.; SEKHARAN, H. P.; CHANDRA, S.; STEWART, J.; HUDSON, H.; BURCHETT, S.; CURTI, B. D.; KAUH, J.; GUTIERREZ, M.; DAVIS, T.; BELVIN, M.; FERRARESI, C.; CHEN, L.; HALLETT, W. H. D.; SELBY, M.; WIGGINTON, J. M.; KOLLMAN, D. M.; KWIATKOWSKI, D. J.; RIBAS, A. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 392, n. 12, p. 1245–1246, 2025.

WU, Lijuan; ZHAO, Jun; ZHANG, Xiaonan; LIU, Shan; ZHAO, Chenyang. Antitumor effect of soluble β -glucan as an immune stimulant. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 116–124, 2021.

XIAO, Zhiyong; ZHOU, Wenxia; ZHANG, Yongxiang. Fungal polysaccharides. *In: Advances in Pharmacology*. [s.l.]: Elsevier, 2020, p. 277–299.

XU, Hui; ZOU, Siwei; XU, Xiaojuan; ZHANG, Lina. Anti-tumor effect of β -glucan from *Lentinus edodes* and the underlying mechanism. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

YADAV, Mahesh; SCHOREY, Jeffrey S. The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3168–3175, 2006.

YAMAMOTO, Masahiro; SATO, Shintaro; HEMMI, Hiroaki; HOSHINO, Katsuaki; KAISHO, Tsuneyasu; SANJO, Hideki; TAKEUCHI, Osamu; SUGIYAMA, Masanaka; OKABE, Masaru; TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. **Science**, v. 301, n. 5633, p. 640–643, 2003.

YANG, Arvin S.; CHAPMAN, Paul B. The History and Future of Chemotherapy for Melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 583–597, 2009.

ZAREMBA, A.; ZIMMER, L.; GRIEWANK, K. G.; UGUREL, S.; ROESCH, A.; SCHADENDORF, D.; LIVINGSTONE, E. Immuntherapie beim malignen Melanom. **Der Internist**, v. 61, n. 7, p. 669–675, 2020.

ZHANG, Yazhuo; LIU, Xinling; ZHAO, Jun; WANG, Jie; SONG, Qiaoling; ZHAO, Chenyang. The phagocytic receptors of β -glucan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 205, p. 430–441, 2022.

ZHANG, Yiran; ZHANG, Meng; JIANG, Yifei; LI, Xiulian; HE, Yanli; ZENG, Pengjiao; GUO, Zhihua; CHANG, Yajing; LUO, Heng; LIU, Yong; HAO, Cui; WANG, Hua; ZHANG, Guoqing; ZHANG, Lijuan. Lentinan as an immunotherapeutic for treating lung cancer: a review of 12 years clinical studies in China. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 11, p. 2177–2186, 2018.

ZHENG, Xing; LU, Fengzhi; XU, Xiaojuan; ZHANG, Lina. Extended chain conformation of β -glucan and its effect on antitumor activity. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 28, p. 5623–5631, 2017.

ZHU, Shuangli; YI, Ming; WU, Yuze; DONG, Bing; WU, Kongming. Roles of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications on therapeutic strategies. **Experimental Hematology & Oncology**, [S.l.], v. 10, p. 60, 2021. DOI: 10.1186/s40164-021-00252-z.

ZOU, Weiping. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 4, p. 295–307, 2006.

ZUNDLER, Sebastian; NEURATH, Markus F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 559–568, 2015.

ANEXO 1

**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 328/2022**Título do projeto:** Avaliação da ação adjuvante de beta-glucanas fúngicas no tratamento do melanoma**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Sara Santos Bernardes**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Patologia**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 06/03/2023. Validade: 06/03/2023 à 05/03/2028.
Belo Horizonte, 06/03/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

APÊNDICE 1

Artigo original a ser submetido na revista *International Immunopharmacology*

The antitumor effect of the (1→3)(1→6)- β -D-glucan Botryosphaeran is dependent on the route of administration and the cytokine IFN- γ

Larissa Ferreira Brito^a, Ana Carolina Bonifácio Leite e Santos^a, Gabriela Souza Watanabe^a, Leonardo de Paula Pereira^b, Bruna Nathália Santos^a, Marina Gonçalves Diniz^c, Aneli M. Barbosa-Dekker^d, Robert F. H. Dekker^d, Sergio Costa Oliveira^e, Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz^e, Remo de Castro Russo^{f*}, Sara Santos Bernardes^{a*}

^aLaboratório de Microambiente Tecidual, Departamento de Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil;

^bLaboratório Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZMINAS) - Belo Horizonte, Brasil;

^cLaboratório de Biologia Integrativa do Câncer, Departamento de Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil;

^dBeta-Glucan Produtos Farmoquímicos EIRELI, Lote 24A, Bloco Zircônia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina, Avenida João Miguel Caram 731, CEP: 86036-700, Londrina, Paraná, Brazil

^eLaboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil;

^fLaboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil;

*Co-corresponding authors

Abstract

Melanoma is an aggressive skin cancer, and its treatment faces several limitations, such as therapeutic resistance. (1→3)(1→6)- β -D-glucans, particularly

those of fungal origin, stimulate the immune response through interaction with pattern recognition receptors, making them promising adjuvants in cancer treatment. The objective of this research was to evaluate whether (1→3)(1→6)-β-D-glucan extracted from the cell wall of *S. cerevisiae* (Wellmune) and that produced by the ascomycete fungus *B. rhodina* (Botryosphaeran) exhibited antitumor activity in melanoma. To achieve this, we compared different administration routes of these substances and their dependence on Toll-like receptors 2 and 4 and the cytokine IFN-γ, using the syngeneic B16-F10 melanoma model implanted in C57BL6 wild-type mice and knockout mice for the aforementioned receptors and cytokine. Only Botryosphaeran, administered orally at a dose of 30 mg/kg every 3 days starting on the fifth day after inoculation of tumor cells into the subcutaneous tissue, was able to significantly decrease tumor volume and weight. Through the evaluation of tumor growth in the aforementioned knockout animals and the intratumoral cytokine profile, we observed that this effect is dependent on TLR4 and IFN-γ.

Keywords: melanoma, (1→3)(1→6)-β-D-glucans, immunotherapy, *S. cerevisiae*, *B. rhodina*, Toll-like receptors, IFN-γ.

1. Introduction

Melanoma is a malignancy of melanocytes[1], and the cutaneous form of the disease causes the majority (75%) of deaths related to skin cancer [2]. Therefore, early identification of this cancer is crucial for the success of patient treatment, once the therapies for regional and systemic disease face limitations in efficacy and access [3,4]. These findings underscore the need for personalized treatment strategies based on individual genetic and immunological profiles [5].

The tumor microenvironment is a highly complex structure composed of neoplastic cells and stromal elements, including endothelial cells, mesenchymal cells, and various populations of immune cells. The dynamic interaction among these components plays a critical role in modulating the immune response and tumor progression, directly influencing the course of the disease [6].

Through the activation of various effectors, cytokines modulate the immune and inflammatory environment, either promoting antitumor immunity (such as IL-12 and IFN- γ) or facilitating tumor progression (such as IL-6, IL-17, and IL-23) [7]. Substances known as immunomodulators have shown the ability to modify the immune cells' response. Many proteins, amino acids, and natural substances exhibit significant regulation over the recruitment and activity of these cells [8]. (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans are polysaccharides with therapeutic metabolic and immunomodulatory effects, with fungal (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans being potent immunostimulants [9; 10]. Since β -glucan is not a molecule produced by mammals, it is recognized mainly by 3 (CR3), dectin-1, and Toll-like receptors (TLR2, TLR4, and TLR9) as a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) [11], and receptor binding also depends on the structure and nature of these polysaccharides [12]. These polysaccharides have been reported to possess potent antitumor activity, and the underlying mechanism may involve tumor growth inhibition through the enhancement of immune functions, such as the activation of macrophages, T cells, B cells, and NK cells, as well as increased levels of cytokines like interferons and interleukins [13].

An important source of these polysaccharides is the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, a yeast widely used in industrial fermentation processes [14] and recognized for its ability to enhance overall immune responses [15]. (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans with (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) linkages extracted from *Saccharomyces cerevisiae* are known to possess immunomodulatory properties, enabling their application in antitumor therapy, as they exhibit anticancer activity both *in vitro* and *in vivo* [15]. Botriospheran is an exocellular (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan produced by the ascomycete fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. It exhibits a triple-helix conformation and has a molecular weight of approximately 1000 kDa [16]. Although the mechanisms underlying its anti-inflammatory effects are not fully understood, its immunomodulatory [17] and antitumoral [18] activity *in vivo* has been recognized. One of the most promising aspects of Botriospheran for therapeutic use is its cost-effective and straightforward production compared to commercially available (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans, as it is secreted into the culture medium during

fermentation and can be extracted from the supernatant using simple methods such as precipitation and dialysis [19].

Considering that (1→3)(1→6)- β -D-glucans from different sources have distinct biological effects, further *in vivo* investigation of these antitumor properties may, in the future, support the development of treatment protocols that incorporate these polysaccharides as adjuvants in advanced melanoma and other aggressive cancers.

2. Methods

2.1 (1→3)(1→6)- β -D-glucans

Botryosphaeran (BOT) was produced under submerged fermentation conditions by the ascomycete fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 using sucrose as the sole carbon source [19]. After 72 hours of growth at 28°C, fungal cultures were harvested by centrifugation (7000 × g / 10 min / 4°C), and the supernatant was separated from the mycelium. BOT present in the culture medium was precipitated by adding three volumes of ethanol, filtered, and subsequently solubilized in distilled water (60°C / 2 h under continuous agitation). The resulting solution was dialyzed in distilled water for 48 hours and then lyophilized. The β -1,3-1,6-glucan extracted from the cell wall of *S. cerevisiae* (Wellmune®) was obtained from Kerry Group, Latin America.

2.2 Experimental Animals

Female wild-type (WT) C57BL/6 mice, aged between 7–10 weeks and with a body weight of approximately 30 grams, were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) and properly housed in the Sectorial Animal Facility of the Animal Experimentation Facility of the Laboratory of Immunology and Pulmonary Mechanics at ICB/UFMG. The animals were kept in polypropylene cages (30×20×13 cm) under controlled conditions of temperature (22 ± 2 °C), humidity (50%), and a 12-hour light-dark cycle, with ad libitum access to water and autoclaved commercial chow (n=40). Male and female mice aged 7–9

weeks, deficient for Toll-like receptors (TLR2^{-/-}, n=12; TLR4^{-/-}, n=14) and for Interferon-gamma receptors (IFN- γ ^{-/-}, n=21), were kindly donated by researcher Sergio Costa Oliveira (Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil), and maintained under pathogen-free conditions throughout the experiment. As controls for the experiments involving knockout animals, 36 female C57BL/6 WT mice were used. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of UFMG (Protocol No. 328/2022).

2.3 Tumor Cell Culture

B16-F10 cells were acquired from the ATCC (American Type Culture Collection) and kindly donated by researcher Enio Ferreira from the Department of General Pathology at UFMG. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM, Gibco - 12100-046), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco - 12657-029) and 1% Antibiotic-Antimycotic solution (Gibco - 15240062), and maintained in an incubator at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.4 Murine Subcutaneous Melanoma Model

B16-F10 cells were cultured until reaching 70–80% confluency, then detached from the culture plate using trypsin-EDTA, washed twice with FBS-free DMEM, and resuspended in FBS-free DMEM mixed with Geltrex™ (a basement membrane matrix with reduced growth factors; Thermo Fisher Scientific) at a 1:1 ratio, at a concentration of 2×10⁶ cells/mL. The right flank region of the mice was shaved, followed by asepsis with 70% alcohol. After homogenizing the cell suspension, 100

μL of the solution (2×10^5 cells) was injected into the subcutaneous tissue of the C57BL/6 mice.

2.5 Experimental Design

Mice were treated either orally (by gavage) or intraperitoneally with the (1→3)(1→6)-β-D-glucans Botryosphaeran and Wellmune®, resuspended in sterile saline, starting on the fifth day after tumor inoculation. A pilot study indicated the presence of a small subcutaneous tumor mass by day 5 following inoculation with 2×10^5 B16-F10 cells. The β-glucan solutions were prepared in sterile saline and administered at a dose of 30 mg/kg [20], with treatments repeated every three days until euthanasia. Control group animals received 100 μL of sterile saline orally on the same schedule. On the 17th day post-inoculation, animals were euthanized using a combination of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Tumors were surgically removed and appropriately preserved for the analyses described in Sections 5.7, 5.8, and 5.9. The same experimental protocol was applied to C57BL/6 mice genetically deficient for TLR2, TLR4, and IFN-γ.

2.6 Tumor Growth Monitoring

Tumor growth was monitored daily starting on the tenth day after B16-F10 cell inoculation. Tumor size was measured using a digital caliper to determine the perpendicular diameters, and tumor volume was calculated using the formula $V \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{1}{2} \times (\text{length} \times \text{width}^2)$ [21].

2.7 Histopathological Analyses

A representative fragment of the tumor from each WT, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and IFN- γ ^{-/-} animal was fixed in buffered formalin for 48 hours, embedded in paraffin, and sectioned into 5 μ m slices for histological slide preparation. The tissues were then deparaffinized and stained with hematoxylin and eosin for histopathological analysis, including mitotic count and assessment of necrotic area. For the evaluation of cell proliferation, brightfield images (40 $\times$ objective, Olympus BX41 microscope with SPOT Insight Color camera) were captured from 5 "hotspot" areas for mitotic figures, totaling an area of 1 mm². The necrotic area was assessed semi-quantitatively using a scoring system: 0 = no necrosis, 1 = 1–25%, 2 = 26–50%, and 3 = >51% of the analyzed tissue area.

2.8 Intratumoral Cytokine Profiling by Cytometric Bead Array (CBA)

A representative tumor fragment from each WT animal, stored at –80°C, was weighed and homogenized in lysis buffer containing a protease inhibitor (cOmplete ULTRA Tablets, Mini EDTA-free, EASY-pack) using a tissue disruptor (50 Hz for 15 minutes). Samples were kept on ice and centrifuged at 8,000 $\times$ g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was collected and analyzed in duplicate for six cytokines using the Human Inflammatory Cytokine Kit (Cytometric Bead Assay, BD Biosciences), following the manufacturer's instructions. The analysis was performed on a BD FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), and data were processed using FCAP Array v3 software (BD Biosciences). Total protein content in the homogenates was quantified by the Bradford method, and cytokine levels were expressed as pg/mg of protein.

2.9 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

A representative tumor fragment from each WT animal, stored at -80°C in Trizol, was weighed and homogenized for total RNA isolation according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using the Veriti 96-Well Thermal Cycler with 2 µg of total RNA in a final volume of 20 µL containing oligo-dT (0.5 µg/µL), 10 mM dNTPs, 0.1 M DTT, 5× buffer, and reverse transcriptase (2 U per reaction), using the following parameters: 42°C for 60 min and 70°C for 15 min, with the High-Capacity cDNA reverse transcription (Thermo Fisher Scientific) kit. The resulting cDNA was used as a template for qPCR in a final volume of 10 µL containing SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, 4309155) and 5 µM of the following primers:

Target gene	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	ID gene
18s	5'-CTCAACACGGGAAACCT CAC-3'	5'-CGCTCCACCAACTAAG AACG-3'	Housekeeping
Ifnb1	5'-AGCTCCAAGAAAGGACG AACAT-3	5'-GCCCTGTAGGTGAGG TTGATCT-3'	IFN-β
Nos2	5'-AGCACTTTGGGTGACCA CCAGGA-3'	5'-AGCTAAGTATTAGAGC GGCGGCA-3'	Inducible Nitric Oxide Synthase;
Arg1	5'-TGACATCAACACTCCCCT GACAAC-3'	5'-GCCTTTTCTTCCTTCC CAGCAG-3'	Arginase
Retnia	5'-CCCTCCACTGTAACGAA GACTC-3'	5'-CACACCAGTAGCAGTC ATCC-3'	Resistin-like alpha (Fizz1)
Ptgs2	5'-GATGCTCTTCCGAGCTG TG-3'	5'-GGATTGGAACAGCAAG GATTT-3'	Cyclooxygenase-2 (COX-2 / Ptgs2)
Il12a	5'-ACGCTACCTCCTCTTTTT GGC-3'	5'-GGGACTGGCTAAGAC ACCTGG-3'	Interleukin-12 (IL-12)

qPCR reactions were performed using the StepOnePlus Real-Time PCR System with the following parameters: 60°C for 10 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, ending with a dissociation curve. Data were analyzed using the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method, which estimates relative gene expression as fold change, normalized to the reference gene (18S) [22]. PCR measurements were performed in duplicate.

2.10 Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (Prism Software, Irvine, CA, USA). All results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, and the ROUT test was applied for outlier detection. Treated groups were compared to the control group using either parametric or non-parametric tests, as appropriate (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test, respectively). Tumor growth curves were analyzed by Two-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparisons between treated groups and the control group. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Treatment with Botryosphaeran by oral administration reduces tumor growth

Animals with B16-F10 tumors were treated or not with Botryosphaeran (BOT) or Wellmune (WM) via oral or intraperitoneal routes at a dose of 30 mg/kg starting on day 5 after the inoculation of 2×10^5 B16-F10 melanoma cells into the subcutaneous tissue. The experimental design is shown in Figure 9A. The

treatments did not influence tumor growth over the experimental period, as assessed by the temporal analysis of tumor volume (Figure 9B). Only oral treatment with BOT (Oral BOT group) significantly reduced tumor weight compared to the control group on the 17th experimental day ($0.7496 \text{ grams} \pm 0.09891$ vs. $1.737 \text{ grams} \pm 0.2645$, $p = 0.0051$, Oral BOT and control groups, respectively), although oral and intraperitoneal treatments with WM decreased tumor weight by 38.81% and 37.14%, respectively (Figure 9C). No alterations in the tumor necrosis area were observed in any of the treatments. However, in all groups treated with the (1→3)(1→6)- β -D-glucans, the mitotic index was approximately half compared to the control group (1.167 ± 0.3073 , 2.167 ± 0.4014 , 1.571 ± 0.2020 , 1.833 ± 0.4014 x 1.750 ± 0.4787 , Oral BOT, IP BOT, Oral WM, IP WM, and control groups, respectively).

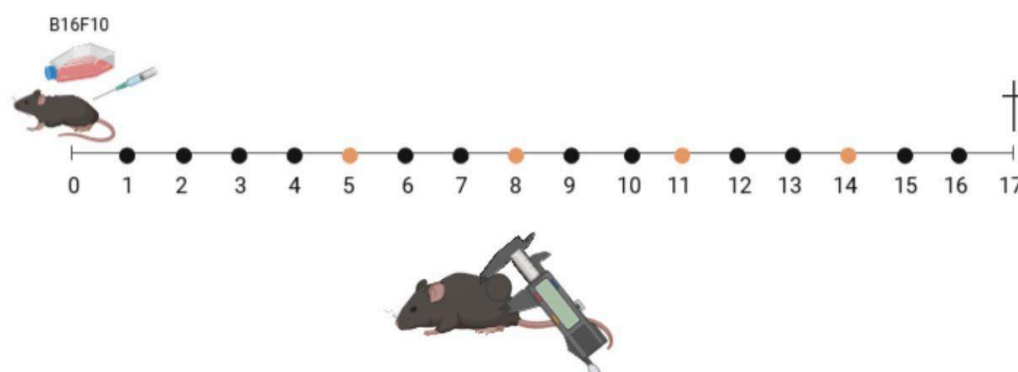
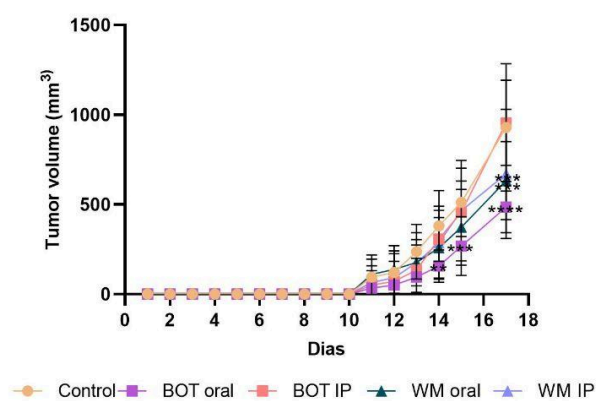
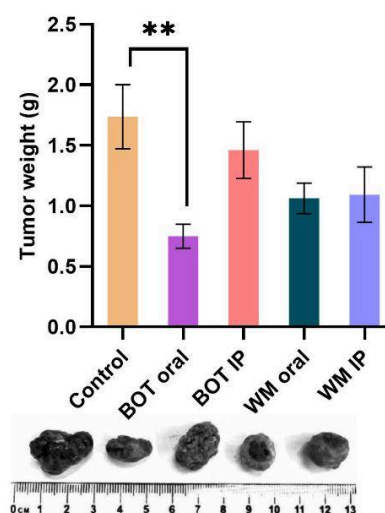
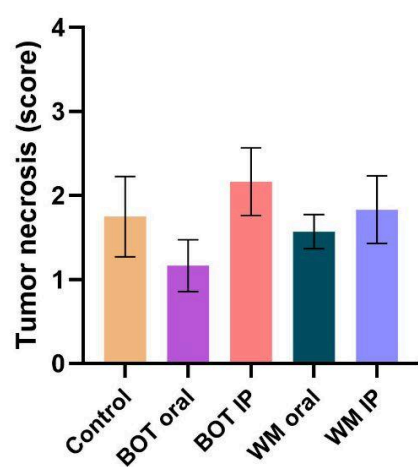
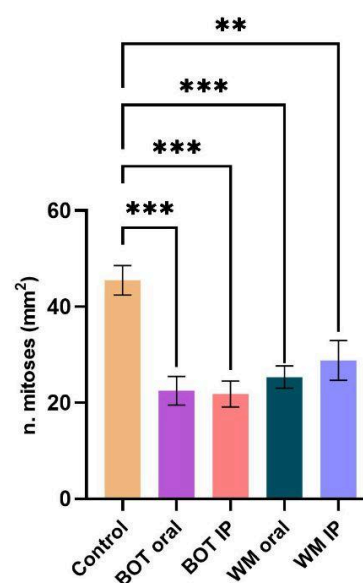
A**B****C****D****E**

Figure 1. Effect of (1→3)(1→6)- β -D-glucan treatments on the growth and tumor weight of subcutaneous B16-F10 melanoma in C57BL/6 mice. Female C57BL/6 wild-type (WT) mice were inoculated with 2×10^5 B16-F10 melanoma cells into the subcutaneous tissue of the back. Treatments with saline via oral (control group), 30 mg/Kg Botryosphaeran via oral (Oral BOT group) or intraperitoneal (IP BOT group), 30 mg/Kg Wellmune via oral (Oral WM group) or intraperitoneal (IP WM group) were administered on days 5, 8, 11, and 14. On day 17, the animals were euthanized, and the tumor was removed for analysis. A) Experimental design; B) Tumor growth curve; C) Tumor weight on the 17th experimental day; D) Tumor necrosis score; and E) Number of mitoses per mm² in the tumor. BOT: Botryosphaeran; WM: Wellmune. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 software (Prism Software, Irvine, CA, USA). All results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test, and the ROUT test was applied to identify outliers. Treated groups were compared to the control group using either parametric or non-parametric tests, as appropriate (One-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc test, or Kruskal–Wallis followed by Dunn’s post hoc test, respectively). Tumor growth curves were analyzed using Two-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc test for comparisons between treated and control groups. Results with $p \leq 0.050$ were considered statistically significant.

As shown in **Figure 2**, the analysis of tumor tissue necrosis did not reveal significant differences between the experimental groups. It was observed that animals treated with WM, regardless of the route of administration, as well as those treated with BOT intraperitoneally, showed a necrosis score close to 2 (26% to 50%), similar to the control group. On the other hand, animals treated with oral BOT maintained a score close to 1 (1% to 25%). However, this difference was not statistically significant. In the mitotic analysis, all treated groups showed statistically significant reductions in mitotic rates compared to the control group.

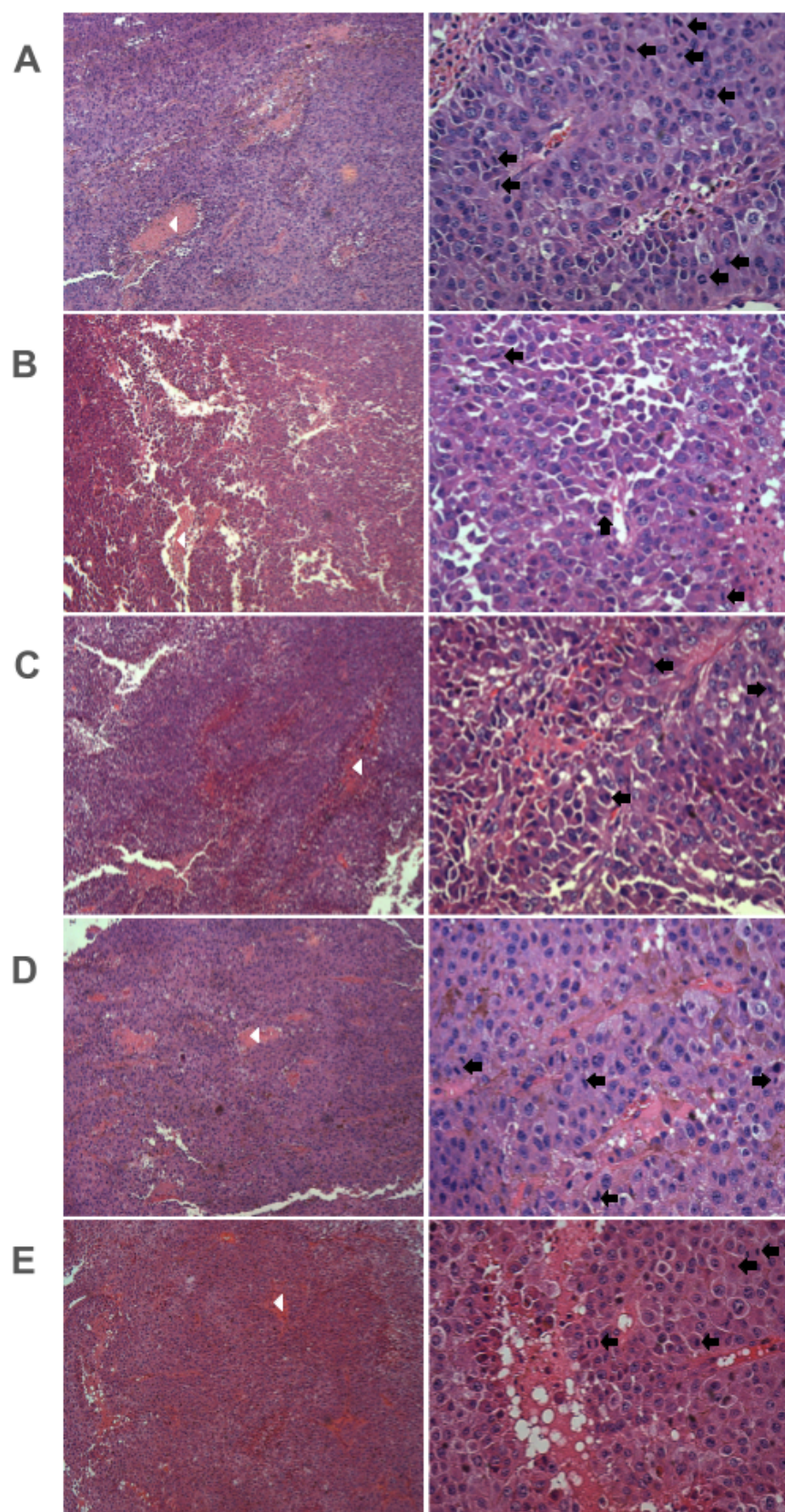


Figure 2. Representative images of necrosis and mitotic index in tumor tissue.

A) Control group, 100X and 400X; B) Oral BOT group, 100X and 400X; C) IP BOT group, 100X and 400X; D) Oral WM group, 100X and 400X; E) IP WM group, 100X and 400X. Black arrows: Mitotic figures; White arrowheads: Necrosis. Staining with H&E.

3.2 Oral treatment with Botryosphaeran reduces tumor weight via increased IFN-gamma cytokine levels

In the analysis of intratumoral cytokine levels in subcutaneous B16-F10 melanoma tumors from animals treated or not with (1→3)(1→6)-β-D-glucans, it was observed that the group treated with BOT orally exhibited increased levels of TNF-α and IL-2, with concentrations approximately 2.2 times higher than the control group, although without statistical significance. Additionally, the levels of interferon-gamma (IFN-γ) were three times greater compared to the control group, showing statistical significance ($p = 0.0479$). In contrast, the other cytokines evaluated (IL-4, IL-6, and IL-10) did not show statistically significant differences when compared to the control group.

Table 1. Intratumoral cytokine levels in subcutaneous B16-F10 melanoma tumors from animals treated or not with (1→3)(1→6)-β-D-glucans.

Gro up	IFN-γ pg/ mg protein ± EPM	TNF-α pg/ mg protein ± EPM	IL-2 pg/ mg protein ± EPM	IL-10 pg/ mg protein ± EPM	IL-4 pg/ mg protein ± EPM	IL-6 pg/ mg protein ± EPM
Con trol	0.155 ± 0.040	1.057 ± 0.162	0.144 ± 0.022	0.572 ± 0.253	0.091 ± 0.049	4.92 ± 2.085
BOT	0.504 ±	2.209 ±	0.349 ±	0.745 ±	0.083 ±	3.772 ±

oral	0.130*	0.702	0.094	0.234	0.040	1.843
BOT	0.299 ±	1.283 ±	0.301 ±	0.477 ±	0.034 ±	2.919 ±
IP	0.104	0.143	0.014	0.117	0.017	0.605
WM	0.233 ±	1.006 ±	0.484 ±	0.515 ±	0.115 ±	1.419 ±
oral	0.039	0.302	0.152	0.255	0.040	0.314
WM	0.255 ±	1.018 ±	0.472 ±	0.465 ±	0.109 ±	7.656 ±
IP	0.049	0.290	0.147	0.194	0.045	4.3

BOT: Botriosferana; EPM: Standard error of the mean; IP: Intraperitoneal; WM: Wellmune. * $p < 0.05$ compared to the control group.

3.3 Action of (1→3)(1→6)- β -D-glucans on the expression of genes related to the antitumoral immune response

The gene expression analysis by qPCR performed on the seventeenth day of the experiment revealed immunomodulatory changes associated with β -glucan treatments, with variations depending on the source and route of administration of the compound. The Arg1 gene showed a slight increase in expression in the groups treated with WM, both orally and intraperitoneally. The Retnla gene exhibited high expression in the groups treated with BOT orally and with WM via both routes. Conversely, the Nos2 gene had increased expression in the group treated with WM via the intraperitoneal route. The expression of the Ptgs2 gene was slightly elevated in all groups treated with both (1→3)(1→6)- β -D-glucans, regardless of the administration route. The Ifnb1 gene showed increased expression in the groups treated with BOT via the intraperitoneal route and with WM orally. Finally, the Il12a gene presented higher expression in the group treated with WM orally.

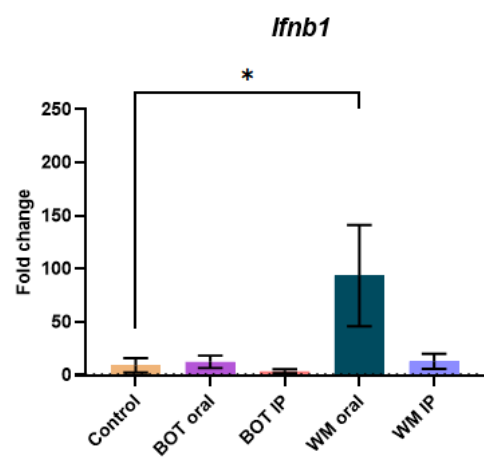
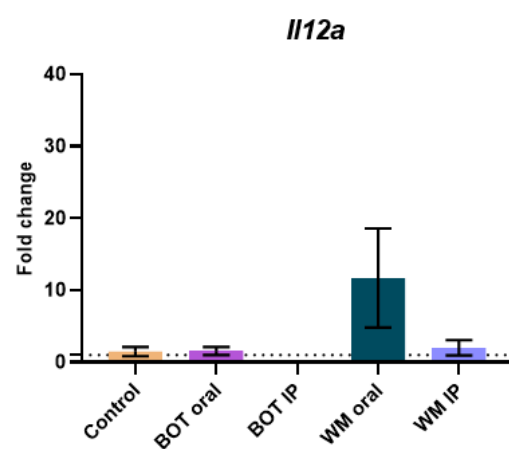
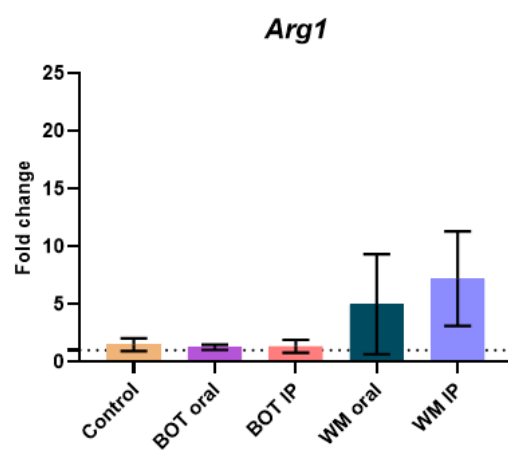
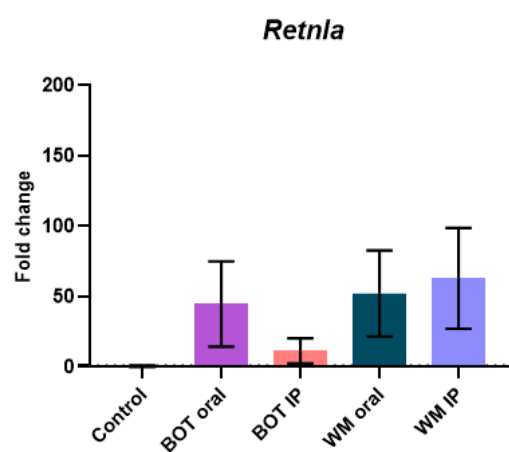
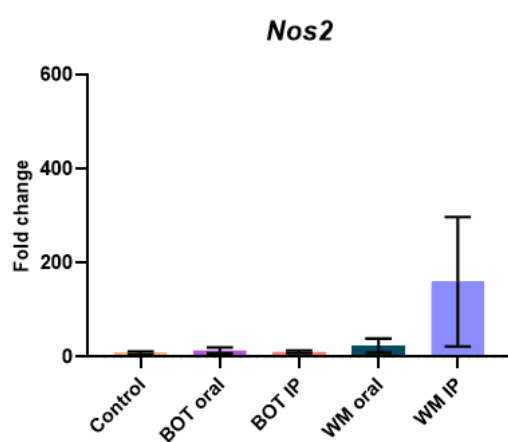
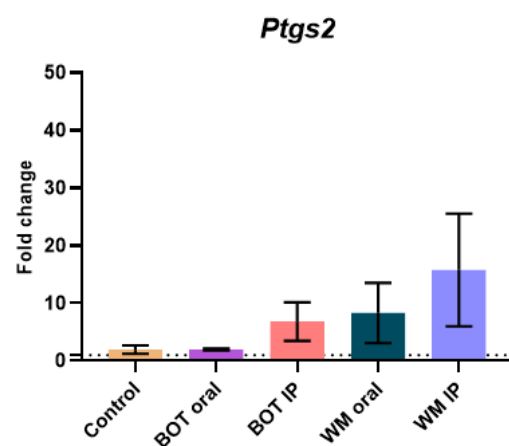
A**B****C****D****E****F**

Figure 3. Effect of (1→3)(1→6)-β-D-glucan treatments on the expression of immune response-related genes in subcutaneous melanoma in WT animals.

A) Fold change in the gene expression of **Ifnb1**; B) Fold change in the gene expression of **Il12a**; C) Fold change in the gene expression of **Arg1**; D) Fold change in the gene expression of **Retnla**; E) Fold change in the gene expression of **Nos2**; F) Fold change in the gene expression of **Ptgs2**. **Arg1**: Arginase; **Retnla**: Resistin-like alpha; **Nos2**: Inducible Nitric Oxide Synthase; **Ptgs2**: Cyclooxygenase-2; **Ifnb1**: Interferon beta; **Il12a**: Interleukin-12.

3.4 Antitumor Action of (1→3)(1→6)-β-D-glucans is Dependent on TLR2, TLR4, and IFN-γ/β Receptors

To evaluate the dependence of the treatment effects on TLR2 and TLR4 receptors, which are known in the literature to be β-glucan receptors, we used *knockouts* mice for these receptors and administered the treatments orally. The choice of oral administration was based on the results of previous experiments with wild-type (WT) animals, where the groups treated with BOT orally showed more favorable responses compared to those treated with the same β-glucan intraperitoneally. As shown in **Figure 12**, we observed that the tumor growth pattern and volume remained similar when compared to the WT animals for both (1→3)(1→6)-β-D-glucans in the TLR2 receptor *knockouts* mice. In the experimental model with TLR4 receptor knockout mice, the tumor growth profiles of the untreated animals (control group) and those treated with BOT orally were similar. In contrast, animals treated with Wellmune (WM) showed a marked increase in tumor growth and weight. Finally, in the experimental model with interferon-gamma (IFN-γ) knockout mice, no differences were observed in tumor growth, tumor volume, or mitotic index when comparing the treated groups to the control group (untreated).

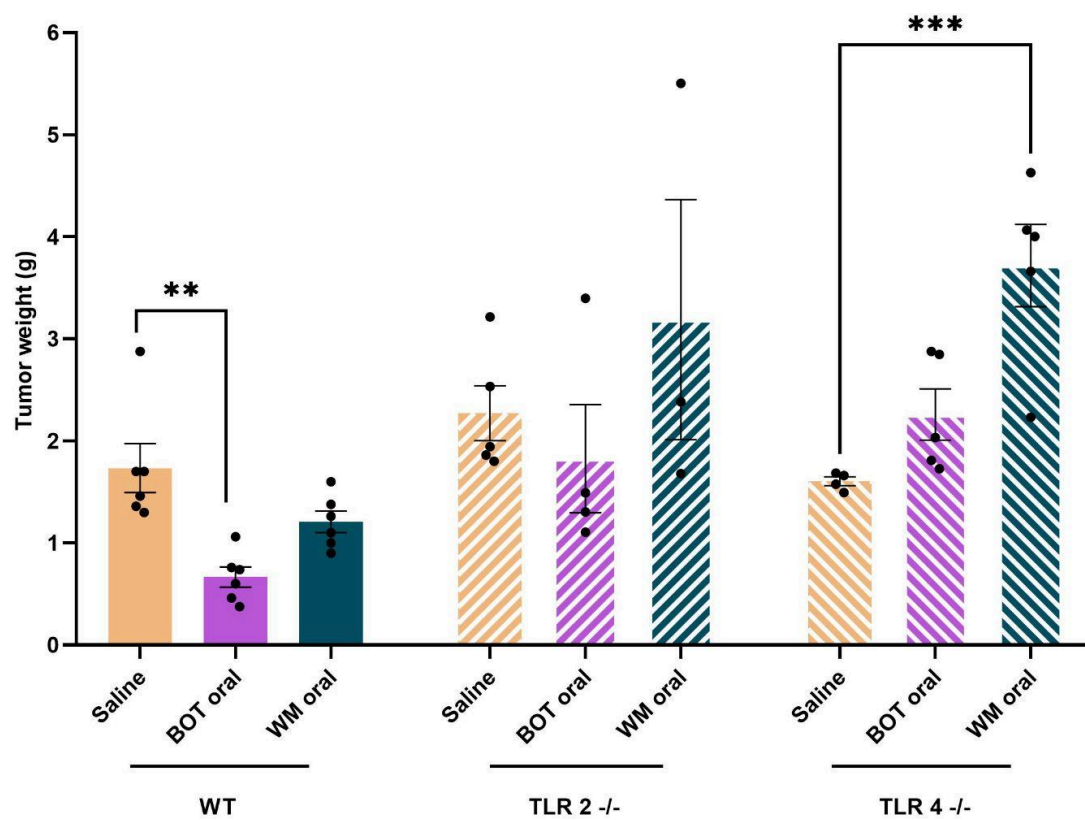
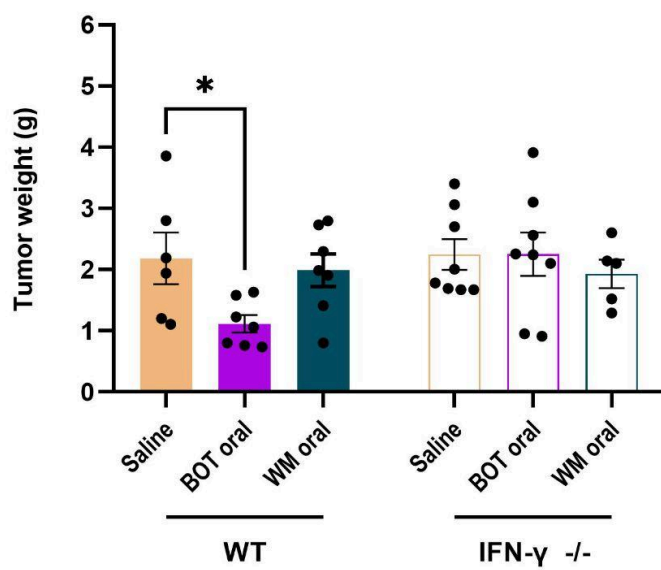
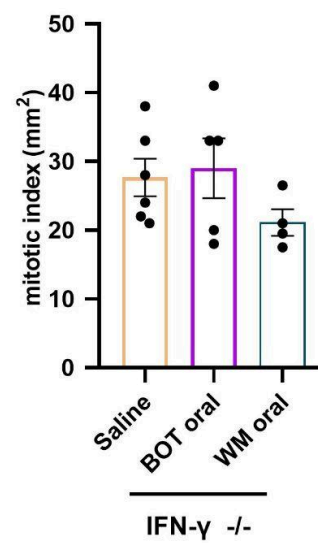
A**B****C**

Figure 4. Effect of (1→3)(1→6)- β -D-glucans Treatments on Tumor Weight of Subcutaneous B16-F10 Melanoma in C57BL/6 Mice *Knockouts* for TLR2, TLR4, and IFN- γ -/-. A) Tumor weight of B16-F10 melanoma implanted in the subcutaneous tissue of C57BL/6 mice *knockouts* for TLR2 and TLR4 receptors; B) Tumor weight of B16-F10 melanoma implanted in the subcutaneous tissue of C57BL/6 mice *knockouts* for IFN- γ receptors; C) Number of mitoses per mm² in the tumor tissue of IFN- γ *knockouts* animals. BOT: Botryosphaeran; IFN- γ : interferon-gama receptor; WM: Wellmune. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 software (Prism Software, Irvine, CA, USA). All results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test, and the ROUT test was applied to identify outliers. Treated groups were compared to the control group using either parametric or non-parametric tests, as appropriate (One-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc test, or Kruskal–Wallis followed by Dunn’s post hoc test, respectively). Tumor growth curves were analyzed using Two-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc test for comparisons between treated and control groups. Results with $p \leq 0.050$ were considered statistically significant.

4. Discussion

(1→3)(1→6)- β -D-glucans possess specific immunomodulatory activities influenced by their molecular structure, origin, and conformation [26, 27], as well as by the route of administration [34], which may explain the variations observed in therapeutic effects. The results obtained reinforce that not only the source but also the route of administration plays a decisive role in the immunomodulatory activity of these bioactive molecules, especially in their therapeutic application for antitumor treatment. In the case of BOT, the route of administration proved important, as antitumor effects were not observed with intraperitoneal (IP) treatment. Our results are consistent with evidence from the literature indicating that the source and route of administration of (1→3)(1→6)- β -D-glucans can significantly impact their

therapeutic activity [23, 24, 25], likely due to differences in bioavailability and in the activation of immune receptors and distinct signaling pathways [26, 27].

Although no statistically significant differences were observed in the tumor necrotic area among the experimental groups, the consistent reduction in cell proliferation suggests that the antitumor effects of the evaluated (1→3)(1→6)- β -D-glucans may be more related to modulation of the cell cycle than to the direct induction of necrosis. It has already been shown that (1→3)(1→6)- β -D-glucans can directly exert antiproliferative activity by arresting the cell cycle at the G0/G1 phase in breast and colorectal cancer cell lines [28], and induce apoptosis, necrosis, and autophagy in *Leishmania amazonensis* promastigotes in vitro [29]. In breast cancer cells as well, Botryosphaeran (BOT) was capable of inducing cytotoxicity and cell cycle arrest in G0/G1, as well as increasing caspase-3 and -7 activity and the expression of the pro-apoptotic gene Bax [30]. The cytostatic effect of BOT in vitro was also observed in leukemia cells [31]. All groups treated with BOT and Wellmune (WM) showed a significant reduction in the mitotic index compared to the control group, indicating a lower tumor proliferation rate. These findings support the hypothesis that the antitumor effect of (1→3)(1→6)- β -D-glucans is partly associated with inhibition of cell proliferation, as the reduction in mitotic figures did not lead to decreased tumor weight in all experimental groups. One possible explanation is that orally administered BOT, in addition to its cytostatic effect, also exerts a pro-apoptotic effect, as it has been shown that oral administration of BOT at the same dose used in this study increased levels of the pro-apoptotic protein Bax in Walker-256 tumors in rats [32]. Furthermore, lentinan, a (1→3)(1→6)- β -D-glucan isolated from the mushroom *Lentinus edodes*, was able to reduce the growth of S-180 sarcoma by about 75%, in addition to inducing apoptosis in cancer cells and promoting infiltration of immune cells into the tumor microenvironment [33].

Fungal (1→3)(1→6)- β -D-glucans bind to specific receptors on innate immune cells, such as Dectin-1, TLRs, and CR3, activating signaling pathways that promote the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 [26, 35]. This interaction plays a fundamental role in coordinating antitumor responses by

activating and recruiting effector cells from both the innate and adaptive immune systems, such as macrophages, NK cells, and cytotoxic T lymphocytes (CD8⁺). As extensively reviewed by Kim and colleagues (2010) [15], the (1→3)(1→6)-β-D-glucan lentinan stimulates macrophages and promotes the functional maturation of dendritic cells, which leads to a significant increase in IL-12 secretion—a key cytokine for inducing a robust Th1 response, with the production of IFN-γ, for example.

The approximately twofold increase in TNF-α and IL-2 levels on day 17 in the group treated orally with BOT reflects the significant rise in IFN-γ levels, demonstrating the integration of the innate and adaptive immune systems. IFN-γ is known for its central role in antitumor immune responses, capable of exerting direct cytotoxic activity on tumor cells by inducing lethal autophagy. Although commonly associated with cell survival, IFN-γ-induced autophagy, through activation of the IRF-1 factor, can lead to programmed cell death [36]. These mechanisms highlight IFN-γ as a direct effector in the destruction of neoplastic cells. Additionally, it promotes activation of CD8⁺ T cells and NK cells, as well as expression of MHC class I molecules, facilitating recognition and elimination of tumor cells through apoptosis induction [37]. IFN-γ also exerts a significant antiproliferative effect on tumor cells by halting the cell cycle—especially in the G1/G0 phases—through increased expression of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitory proteins [38]. Therefore, the significant increase in intratumoral IFN-γ observed in animals treated orally with BOT on day 17 demonstrates a positive modulation of the antitumor immune response, reinforced by the reduction in tumor volume and weight.

The modulation of IFN-β and IL-12 gene expression was also shown to depend on the route of administration, as observed in the WM treatment group. These findings are consistent with literature data pointing to the oral route as an effective strategy to enhance the immune response induced by (1→3)(1→6)-β-D-glucans. Previous studies have shown that when (1→3)(1→6)-β-D-glucan particles derived from *Saccharomyces cerevisiae* (WGP) are administered orally, they pass through the gastrointestinal tract intact and are taken up by intestinal macrophages. Within these phagocytes, WGP is processed

into bioactive β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan fragments, which are then transported to the bone marrow, spleen, and draining lymph nodes, where they interact with other immune cells, promoting the coordinated activation of both innate and adaptive immune responses [34].

Treatment with WM did not result in a significant increase in IFN- γ levels, suggesting that its partial effect on B16-F10 melanoma proliferation and growth occurred through other pathways—possibly involving type I IFN activity, as greater *Ifnb1* gene expression was observed in animals treated orally with WM. In vivo, oral administration of a (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan extracted from *S. cerevisiae* cell walls in mice with solid tumors induced a significant conversion of tumor-associated macrophages (TAMs) from an immunosuppressive M2 phenotype to a pro-inflammatory and antitumor M1 phenotype, evidenced by increased expression of inflammatory cytokines such as IL-12, TNF- α , and IL-6, and decreased expression of M2-associated mediators such as IL-10 and arginase-1. Simultaneously, an increase in effector T cell activation was observed, marked by elevated IFN- γ production by CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T lymphocytes in the tumor microenvironment [39]. At the evaluated time point (17 days), the treatments did not show significant changes in the expression of genes related to M1 and M2 macrophage phenotypes.

The literature describes that (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans can bind to various pattern recognition receptors (PRRs) and activate inflammatory signaling pathways, thereby inducing an immune response [26]. Tumor growth analysis in TLR2-deficient mice showed that, in animals treated orally with the (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan BOT, tumor growth patterns and volumes were similar to those observed in wild-type (WT) animals, although differences did not reach statistical significance. These data suggest that the specific absence of TLR2 may not impair the antitumor effects of BOT, possibly due to its ability to interact with multiple immune cell receptors beyond TLR2. However, it is important to emphasize that these results still need to be replicated and confirmed, as the involved receptors may act synergistically, potentially masking individual effects.

When evaluating the same model in TLR4-deficient mice, a more prominent phenotype regarding the involvement of these receptors in tumor control was

observed. Mice treated with oral BOT showed no significant differences compared to the control group, unlike what was observed in WT animals, suggesting that the antitumor effects of this molecule are, at least in part, dependent on the functional presence of this receptor. TLR4 is widely recognized for its role in activating immune responses, being capable of recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) as well as certain complex carbohydrates such as (1→3)(1→6)-β-D-glucans. Its activation triggers signaling through two main pathways: MyD88 and TRIF. Both culminate in the activation of transcription factors such as NF-κB and IRFs, leading to the production of pro-inflammatory cytokines and type I interferons, such as IFN-β [40, 41]. Previous studies have shown that TLR4 activation can also indirectly induce the production of IFN-γ, another key cytokine in adaptive immune responses, particularly in antitumor contexts [42]. The production of this cytokine is essential for the activation of macrophages and CD8⁺ T cells, favoring macrophage polarization to the M1 phenotype and promoting a cytotoxic response against tumor cells. Additionally, other studies highlight the central role of TLR4 in mediating antitumor immune responses through the induction of IFN-γ and other inflammatory cytokines [43, 44].

TLR4^{-/-} mice treated with oral (1→3)(1→6)-β-D-glucan WM showed a significant increase in tumor weight at the end of the experimental period. Our findings indicate that this receptor plays an essential role in the tumor growth control mediated by WM administration, particularly through TRIF pathway activation. This hypothesis is supported by the observation of a significant increase in *Ifnb1* gene expression in WT mice—a cytokine characteristic of the TRIF pathway, whose production is induced by transcription factors such as IRF3 and NF-κB [45]. However, although IFN-β may be involved in the slight, yet non-significant, tumor reduction observed with oral WM administration, its direct contribution cannot yet be confirmed.

A potential future approach could involve the use of IFNAR^{-/-} mice to determine whether the absence of this pathway results in a phenotype similar to that observed with oral WM, characterized by increased tumor growth. The TRIF pathway is known to activate the production of type I interferons such as IFN-β, which play a

crucial role in modulating the inflammatory response. In the tumor context, IFN- β production can influence the tumor microenvironment and promote an antitumor immune response [46]. The absence of TLR4 may prevent the activation of this pathway, resulting in the lack of IFN- β and increased tumor growth compared to control animals.

Studies using the particulate (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan Zymosan—derived from *S. cerevisiae*—and the soluble (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan Laminarin—derived from the algae *Laminaria digitata*—conducted by Kanjan and colleagues (2017) [47] showed that, *in vitro*, their immunomodulatory effects depend on the combined interaction between Dectin-1 and TLR2, TLR4, and TLR5, being influenced by both the physical form (particulate or soluble) and the specific variant of the Dectin-1 receptor. TLR2 and TLR4, in particular, negatively regulate Dectin-1 activation, while TLR5 does not appear to play a significant role in this context. Laminarin demonstrated immunomodulatory effects dependent on the coexpression of Dectin-1A and TLR4. Its solubility and structure limited the intensity of the immune response compared to Zymosan, highlighting the importance of physical form and receptor interactions in inflammation modulation.

It is well established that inflammation plays an ambivalent role in cancer, depending on the context. While acute inflammatory responses can contribute to the elimination of tumor cells, sustained (chronic) inflammation may promote tumor progression by activating pro-oncogenic pathways, inducing DNA damage with resulting genomic instability, and promoting angiogenesis [48, 49]. Temporal evaluation of immune response activation products in WT animals treated with BOT and WM, as well as a better understanding of these inflammatory mediators in receptor-deficient animals (TLRs and Dectin), are necessary for a deeper comprehension of the receptor interactions and the role of the inflammatory response induced by (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans in antitumor therapy.

Finally, in oral treatments performed on IFN- γ ^{-/-} mice, no significant differences were observed in tumor weight or mitotic index compared to the control group. This suggests that IFN- γ production—also evidenced by increased levels of this cytokine in tumor tissue detected by CBA analysis—is an essential component

for mediating the antitumor effects observed, particularly in the case of oral BOT. These findings are consistent with studies highlighting the central role of IFN- γ in antitumor immunity, especially due to its cytostatic effects on tumor cells [38].

Taken together, our results indicate that the antitumor effect of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans depends both on the route of administration and the source of the glucan, with oral BOT being the most effective. Its action appears to rely on the activation of innate immune receptors (TLR2 and TLR4), as well as on the production of inflammatory cytokines such as IFN- γ , in order to exert its protective potential in antitumor therapy.

5. Conclusion

This study allows us to conclude that oral administration of the (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan Botryosphaeran significantly reduced tumor volume and weight in C57BL/6 WT mice bearing subcutaneous B16-F10 melanoma. This effect was not observed when Botryosphaeran was administered intraperitoneally, suggesting that its antitumor efficacy is associated with its passage through the gastrointestinal tract. However, further investigations are needed to better elucidate this mechanism. The data obtained indicate that, at least in part, this (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan exerts its antitumor activity through modulation of the immune response, particularly via activation of the TLR4-mediated signaling pathway and production of IFN- γ . These findings reinforce the immunomodulatory potential of this (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan and highlight the importance of activating specific pathways of the innate and adaptive immune systems in controlling tumor growth.

In contrast, the (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan Wellmune did not show a significant effect on tumor control and led to increased tumor growth in the absence of the TLR4 receptor. This receptor is required for the production of IFN- β , whose gene expression was found to be increased in the oral Wellmune group at the end of the experimental period. Thus, this pathway appears to be crucial for controlling tumor growth in animals treated with this (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan.

Further evaluation of other immune system pathways and the effects of these

treatments on melanoma cell survival are essential to better understand the mechanisms involved. Research into the antitumor potential of (1→3)(1→6)-β-D-glucans opens promising avenues for their use in combination with other systemic treatments for melanoma, such as dacarbazine and immune checkpoint inhibitors.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) Grant No. RED-00031-21 [Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Immunobiológicos e Biofármacos no Câncer].

References

- [1] SCHADENDORF, Dirk; FISHER, David E.; GARBE, Claus; GERSHENWALD, Jeffrey E.; GROB, Jean-Jacques; HALPERN, Allan; HERLYN, Meenhard; MARCHETTI, Michael A.; McARTHUR, Grant; RIBAS, Antoni; ROESCH, Alexander; HAUSCHILD, Axel. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, [S.l.], v. 1, n. 15003, p. 1–20, 2015.
- [2] SCHADENDORF, Dirk; HAUSCHILD, Axel. Melanoma—the run of success continues. *Nature Reviews Clinical Oncology*, [S.l.], v. 11, p. 75–76, jan. 2014.
- [3] CORTEZ, J. L.; VASQUEZ, J.; WEI, M. L. The impact of demographics, socioeconomic, and health care access on melanoma outcomes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 84, n. 6, p. 1677–1683, 1 jun. 2021.
- [4] LONG, Georgina V.; SWETTER, Susan M.; MENZIES, Alexander M.; GERSHENWALD, Jeffrey E.; SCOLYER, Richard A. Cutaneous melanoma. *The Lancet*, v. 402, n. 10400, p. 485–502, 1 ago. 2023. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00821-8.

- [5] ROESCH, Alexander; SCHADENDORF, Dirk. Resistance to Targeted Therapy in Melanoma. In: DUMMER, Reinhard (ed.). *Recent Results in Cancer Research*. Cham: Springer, 2018. v. 211, p. 83–92.
- [6] DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 1, p. 24–37, jan. 2006.
- [7] GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, [S.l.], v. 140, n. 6, p. 883–899, 19 mar. 2010.
- [8] SAROJ, P.; VERMA, M.; JHA, K.; PAL, M. An overview on immunomodulation. *Journal of Advanced Scientific Research* vol. 3, 2012
- [9] Du, B., Meenu, M., Liu, H., & Xu, B. (2019). A concise review on the molecular structure and function relationship of β -glucan. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 4032. <https://doi.org/10.3390/ijms20164032>
- [10] CASTRO, E. D. M.; CALDER, P. C.; ROCHE, H. M., 2021
- [11] Stier, H., Ebbeskotte, V., & Gruenwald, J. (2014). Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. *Nutrition Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-38>
- [12] Mueller, A., Raptis, J., Rice, P. J., Kalbfleisch, J. H., Stout, R. D., Ensley, H. E., Browder, W., & Williams, D. L. (2000). The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1-->3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology*, 10(4), 339–346. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.4.339>

- [13] Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Suzuki, T., & Sakanaka, M. (2006). Antitumor and antimetastatic activity of a novel water-soluble low molecular weight α -1, 3-D-glucan (branch α -1, 6) isolated from *Aureobasidium pullulans* 1A1 strain black yeast. *liarjournals.org*. <https://ar.liarjournals.org/content/anticancer/26/6B/4131.full.pdf>
- [14] MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Beta-glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. Universidade Estadual de Londrina/Londrina - Paraná: Semina: Ciências Agrárias vol. 29, 2008.
- [15] KIM, Wan-Jae. Et al. Immunostimulating Activity of Beta-Glucan Isolated from the Cell Wall of Mutant *Saccharomyces cerevisiae*, and Its Anti-Tumor Application in Combination with Cisplatin. Korea: The Korean Journal of Food and Nutrition vol. 23, 2010.
- [16] Dekker, R. F. H., & Barbosa-Dekker, A. M. (2021). Botryosphaeran: An unusual exocellular fungal $(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)$ - β -D-glucan with notable biomedical applications. Em *Polysaccharides of Microbial Origin* (p. 1–17). Springer International Publishing.
- [17] SILVA, Nubia. Et al. Oral administration of botryosphaeran [$(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)$ - β -d-glucan] reduces inflammation through modulation of leukocytes and has limited effect on inflammatory nociception. *Cell biochemistry and function* vol. 40, 2022
- [18] COMIRAN, Patricia K. Et al. Botryosphaeran Attenuates Tumor Development and the Cancer Cachexia Syndrome in Walker-256 Tumor-Bearing Obese Rats and Improves the Metabolic and Hematological Profiles of These Rats. *Nutrition and Cancer* vol. 73, 2021
- [19] DEKKER, Robert F. H. Et al. Botryosphaeran – A Fungal Exopolysaccharide of the $(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)$ - β -D-Glucan Kind: Structure and Biological Functions. *Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices* vol.12, 2019.

- [20] DING, Chuanlin; SHRESTHA, Rejeena; ZHU, Xiaojuan et al. Inducing trained immunity in pro-metastatic macrophages to control tumor metastasis. *Nature Immunology*, v. 24, n. 2, p. 239–254, fev. 2023. DOI: 10.1038/s41590-022-01388-8.
- [21] GAST, Charles E. et al. Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival. *Science Advances*, Washington, v. 4, n. 9, eaat7828, 12 set. 2018. DOI: 10.1126/sciadv.aat7828.
- [22] RAO, Xiayu; HUANG, Xuelin; ZHOU, Zhicheng; et al. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis - PMC. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, v. 3, n. 3,
- [23] SONG, Q. et al. A β -1,3/1,6-glucan enhances anti-tumor effects of PD1 antibody by reprogramming tumor microenvironment. *International journal of biological macromolecules*, v. 279, n. Pt 1, p. 134660, nov. 2024.
- [24] SU, F. et al. A β -1,3/1,6-glucan from *Durvillaea Antarctica* inhibits tumor progression in vivo as an immune stimulator. *Carbohydrate Polymers*, v. 222, p. 114993–114993, 1 out. 2019.
- [25] ZHENG, X. et al. Extended chain conformation of β -glucan and its effect on antitumor activity. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 5, n. 28, p. 5623–5631, 1 jan. 2017.
- [26] BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cellular Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 471–479, 9 mar. 2005.
- [27] BROWN, G. D. et al. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 197, n. 9, p. 1119–1124, 28 abr. 2003.

[28] JEDINAK, A. et al. Pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) inhibits growth of human breast and colon cancer cells through inhibition of cell cycle and induction of apoptosis. BMC Complementary and Alternative Medicine, London, v. 11, p. 60, 2011. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-60>

[29] CARLOTO, A. C. M. et al. Botryosphaeran, [(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan], induces apoptosis-like death in promastigotes of *Leishmania amazonensis*, and exerts a leishmanicidal effect on infected macrophages by activating NF- κ B and producing pro-inflammatory molecules. Chemico-biological interactions, v. 351, n. 109713, p. 109713, 2022.

[30] QUEIROZ, E. A. I. F. et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular β -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. The international journal of biochemistry & cell biology, v. 67, p. 14–24, 2015.

[31] MALINI, M. et al. Modulation of gene expression and cell cycle by botryosphaeran, a (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucan in human lymphocytes. International journal of biological macromolecules, v. 77, p. 214–221, 2015.

[32] GERALDELLI, Danielli. Et al. Tumor development in rats and cancer cachexia are reduced by treatment with botryosphaeran by increasing apoptosis and improving the metabolic profile.

[33] XU, H. et al. Anti-tumor effect of β -glucan from *Lentinus edodes* and the underlying mechanism. Scientific reports, v. 6, p. 28802, 2016.

[34] HE, L. et al. Oral administration of a whole glucan particle (WGP)-based therapeutic cancer vaccine targeting macrophages inhibits tumor growth. Cancer immunology, immunotherapy: CII, v. 71, n. 8, p. 2007–2028, 2022.

[35] GOODRIDGE, H. S.; WILSON, J. W.; KIM, C. H.; et al. Dectin-1 and other β -glucan receptors in the immune response. *Immunological Reviews*, v. 230, p. 121-131, 2009. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00783.x.

[36] Qian, Y., et al. (2011). Interferon- γ -induced autophagy in hepatoma cells through the IRF-1-mediated pathway. *Autophagy*, 7(5), 546–558.

[37] IKEDA, H.; HAZEKAWA, M.; TAKEDA, K.; et al. The roles of interferon- γ and other immune modulators in tumor immunity. *Journal of Immunology*, v. 169, p. 5107-5115, 2002. doi: 10.4049/jimmunol.169.9.5107.

[38] CHEN, Y.; NIU, N.; XUE, J. Double-edged roles of IFN γ in tumor elimination and immune escape. *Journal of Pancreatology*, v. 6, n. 1, p. 8–17, 30 jan. 2023.

[39] LIU, M. et al. Dectin-1 activation by a natural product β -glucan converts immunosuppressive macrophages into an M1-like phenotype. *The journal of immunology*, v. 195, n. 10, p. 5055–5065, 2015.

[40] AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

[41] SAVITSKY, D. et al. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, v. 59, n. 4, p. 489–510, 2010.

[42] MATSUURA, M. et al. A pathway through interferon-gamma is the main pathway for induction of nitric oxide upon stimulation with bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal cells. *European journal of biochemistry*, v. 270, n. 19, p. 4016–4025, 2003b.

- [43] SAHASRABUDHE, S. S.; GOLTZ, J. M.; KENDALL, J. S. et al. β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* induces a macrophage response that is regulated by the NF- κ B pathway. *Journal of Immunology*, v. 196, p. 1102-1110, 2016.
- [44] VITIELLO, G. A. F. et al. Antiviral responses in cancer: Boosting antitumor immunity through activation of interferon pathway in the tumor microenvironment. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 782852, 2021.
- [45] HAN, K.-J. et al. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF- κ B activation and apoptosis pathways. *The journal of biological chemistry*, v. 279, n. 15, p. 15652–15661, 2004.
- [46] GELLERT, J. et al. Tumoral interferon beta induces an immune-stimulatory phenotype in tumor-associated macrophages in melanoma brain metastases. *Cancer research communications*, v. 4, n. 8, p. 2189–2202, 2024.
- [47] POCHANART KANJAN et al. Immune effects of β -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. *Journal of Functional Foods*, v. 37, p. 433–440, 17 ago. 2017.
- [48] ZHAO, H. et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, n. 1, 12 jul. 2021.
- [49] GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, v. 51, n. 1, p. 27–41, jul. 2019.