

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE TUMORAL ÁCIDO SOBRE A
RESPOSTA IMUNE NO CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Rita de Kássia Souza

Porto Alegre

Agosto, 2024

RITA DE KÁSSIA SOUZA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE TUMORAL ÁCIDO SOBRE A
RESPOSTA IMUNE NO CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Visioli

Porto Alegre, 2024

AGRADECIMENTOS

Não vejo maneira mais autêntica de expressar gratidão pela elaboração desta dissertação do que chamando-a de “nossa”. Quando digo “nossa”, refiro-me a todos aqueles que estiveram ao meu lado durante esse período, ao longo desses anos intensos, compartilhando esta jornada e este trabalho.

À minha querida mãe Elci (*in memoriam*), grande amor da minha vida e inspiração como mulher forte, guerreira, batalhadora e também exemplo de educadora. Palavras não são suficientes para expressar essa falta em todos os dias da minha vida.

Ao meu pai José, que quando tudo parecia ter dado errado e éramos a companhia um do outro dispôs de uma energia, que talvez nem ele sabia que tinha, para me encorajar a ir atrás dos meus sonhos, mesmo que para isso tivéssemos que viver longe e ambos sozinhos. Agradeço por me dar todo o suporte possível desde o início, por me ensinar e sempre fortalecer os valores que hoje carrego comigo. Meu maior incentivador e dono do abraço apertado que eu sei que sempre vai estar me esperando. Queria agradecer também à Adriana, que desde que chegou em nossas vidas não poupou esforços e carinho para ver todo mundo bem e feliz.

Aos meus irmãos Joice e Josué, que mesmo longe sempre se fazem presentes de um jeito ou de outro. Que nunca largaram a minha mão e, mais importante, nunca deixaram com que faltasse amor, coragem e determinação. Ao meu sobrinho Joaquim, minha calma e minha fonte de energias.

Aos meus grandes amigos e colegas de profissão, Victor, Amanda, Deisi, Érick, Igor, Luiza, Leonardo, Roane, Mariana, Nathália, Ana, Roane e a todos os demais que fizeram parte dos meus dias como mestrandia, vocês foram essenciais nessa jornada e cada um tem um lugar muito especial no meu coração.

Aos queridos professores da Patologia Bucal - UFRGS com quem tive o prazer de conviver, especialmente ao professor Pantelis, Márcia, Natália e Laura. Obrigada por cada oportunidade de aprendizado, cafézinho compartilhado, conselho e principalmente por tornarem a faculdade um ambiente acolhedor e humanizado. Exemplos de educadores e pessoas maravilhosas.

À minha orientadora Fernanda Visioli. Verdadeiro modelo de profissionalismo, feminilidade, maternidade e dedicação à pesquisa. Te admiro em todos os aspectos e agradeço por me incentivar a prosseguir na ciência em um país onde o apoio à pesquisa é escasso. Sou grata pelo seu olhar humano e empático, pelos conselhos que iam além do trabalho de pesquisa e pelos tantos abraços afetuosos que me acolheram durante essa trajetória. Obrigado por confiar em mim e me encorajar a alcançar novos patamares. Seguimos juntas.

Caminho se conhece andando
Então vez em quando é bom se perder
Perdido fica perguntando
Vai só procurando
E acha sem saber

Perigo é se encontrar perdido
Deixar sem ter sido
Não olhar, não ver
Bom mesmo é ter sexto sentido
Sair distraído, espalhar bem-querer
Deus me Proteja, Chico César

RESUMO

Uma característica marcante do microambiente dos tumores sólidos é a acidificação do pH extracelular. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do microambiente tumoral (MT) ácido sobre os mecanismos de evasão à resposta imune mediada por células T contra o carcinoma espinocelular bucal (CEC). Primeiramente foi realizado o cultivo celular das linhagens de CEC de boca (SCC25) e linfócitos T de leucemia aguda (Jurkat) de forma individual, separadas em diferentes grupos, meio neutro (pH 7.4) e ácido modificado com ácido clorídrico HCl (pH 6.8), e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, além de serem monitoradas diariamente em microscópio invertido de fase (Biostar, American Optical). Em um segundo momento foi realizado o co-cultivo dessas duas linhagens em diferentes condições experimentais e posteriormente foram avaliados desfechos em tempos experimentais distintos, como os efeitos do meio de cultura acidificado sobre os índices de morte celular de linfócitos T e das células de CEC através de ensaios de Duplicação Cumulativa da População (CPD), Imunofluorescência, Western Blot, secreção das citocinas inflamatórias interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN γ) utilizando o kit Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), bem como a expressão das moléculas de reconhecimento celular PD-1 e PD-L1 por meio de citometria de fluxo, além da formação de esferas através de Cultura 3D em co-cultivo com análise morfométrica e de densidade óptica (OD). A análise estatística foi realizada através dos testes ANOVA ou ANOVA two-way, seguidos do teste de Bonferroni, post-hoc de Tukey ou teste t de Student, conforme apropriados, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA). Após exposição ao meio ácido, a análise de CPD indicou diminuição da capacidade proliferativa das células T ($p < 0.001$) e aumento nas células cancerígenas ($p < 0.01$), além de diminuir a viabilidade das células imunes. Observou-se ainda que a acidez do MT promove alterações fenotípicas e morfológicas nas células SCC25, além de aumentar a expressão do marcador de transição epitélio-mesênquima (TEM) Vimentina. O pH ácido contribui para maior resistência das células malignas à morte induzida pelas células T ($p < 0.001$). Não detectamos diferença na proporção de células SCC25 positivas para PD-L1 quando expostas ao meio ácido. Em contrapartida, vemos uma diminuição discreta e não significativa de PD-1 nas células T cultivadas em pH 6.8. Esferas formadas pelas células tumorais SCC25 isoladamente em seu meio ótimo para crescimento DMEM F12 demonstraram inicialmente diminuição da sua área e perímetro, além de semelhança no tamanho e agregação durante todo o período do experimento ($p < 0.001$). Em contrapartida os esferóides mantidos em ambiente ácido apresentaram uma diminuição de área e perímetro nas primeiras 24h, seguidos por um período de estabilidade ($p < 0.001$). Com relação a densidade óptica, as esferas nessa condição apresentaram uma OD média inicial em 12 horas significativamente mais alta ($p < 0.001$) comparada com os grupos citados anteriormente, a qual diminuiu a partir desse período até o final do tempo experimental e que finalizou com um valor OD menor do que as esferas em pH 7.4 ($p < 0.001$). O co-cultivo de células tumorais SCC25 com células T resultou em esferas expandidas independentemente do pH, com crescimento ligeiramente maior em pH 6.8 ($p < 0.05$). Os esferóides em meio ácido inicialmente apresentaram menor OD ($p < 0.001$), mas essa diferença diminuiu após 72 horas. No entanto, não foi possível o processamento histológico dessas esferas devido à tendência de desagregação. No sistema de co-cultivo houve maior secreção de IFN γ em meio ácido ($p > 0.05$). Não foi detectado IFN γ em SCC25 ou células T isoladamente em pH 7.4 ou 6.8. Os níveis de IL-2 aumentaram nas células SCC25 em pH 6.8, mas sem significância estatística; não foi detectada IL-2 nas células T em pH neutro ou ácido. Os achados deste estudo destacam a influência exercida pela acidez do MT na evasão das células cancerígenas à resposta imune e na progressão do CEC bucal, diminuindo a viabilidade e função das células T.

Palavras-chave: Câncer bucal; acidez tumoral; resposta imune; células T; IL-2; TNF-alpha; interferon-gama; PD-L1; PD-1.

ABSTRACT

A striking feature of the microenvironment in solid tumors is the acidification of the extracellular pH. The aim of this study was to analyze the effects of acidic tumor microenvironment (TME) on mechanisms of evasion from T cell-mediated immune response against oral squamous cell carcinoma (OSCC). Initially, individual cell cultures of OSCC (SCC25) and acute leukemia T lymphocytes (Jurkat) were established and maintained under different experimental conditions: neutral medium (pH 7.4) and acidified medium with hydrochloric acid (HCl) (pH 6.8) at 37°C and 5% CO₂. Daily monitoring was performed using a phase inverted microscope (Biostar, American Optical). Subsequently, co-culture of these two cell lines under various conditions was conducted, and outcomes were evaluated at different time points. These included the effects of acidified culture medium on cell death rates of T lymphocytes and OSCC cells using Cumulative Population Doubling (CPD) assays, Immunofluorescence, Western Blot, secretion of inflammatory cytokines interleukin-2 (IL-2) and interferon-gamma (IFN γ) assessed using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits, as well as the expression of cell recognition molecules PD-1 and PD-L1 by flow cytometry. Additionally, 3D sphere formation was assessed in co-culture with morphometric and optical density (OD) analyses. Statistical analysis was performed using ANOVA or two-way ANOVA, followed by Bonferroni's test, Tukey's post-hoc test, or Student's t-test, as appropriate, using the GraphPad Prism 5.0 program (La Jolla, CA). After exposure to acidic medium, CPD analysis indicated decreased proliferative capacity of T cells ($p < 0.001$) and increased proliferation in cancer cells ($p < 0.01$), along with decreased viability of immune cells. Phenotypic and morphological changes were observed in SCC25 cells due to TME acidity, accompanied by increased expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker Vimentin. Acidic pH contributed to enhanced resistance of malignant cells to T cell-induced cell death ($p < 0.001$). There was no significant difference detected in the proportion of PD-L1-positive SCC25 cells when exposed to acidic medium. Conversely, a slight non-significant decrease in PD-1 expression was observed in T cells cultured at pH 6.8. SCC25 tumor cell spheroids cultured alone in optimal growth medium (DMEM F12) initially showed decreased area and perimeter, with consistent size and aggregation throughout the experiment ($p < 0.001$). In contrast, spheroids maintained in acidic environment exhibited decreased area and perimeter within the first 24 hours, followed by stability ($p < 0.001$). Regarding optical density, spheroids in acidic conditions initially had significantly higher average OD at 12 hours ($p < 0.001$) compared to other groups, which decreased over time and ended with a lower OD compared to pH 7.4 spheroids ($p < 0.001$). Co-culture of SCC25 tumor cells with T cells resulted in expanded spheroids regardless of pH, with slightly greater growth at pH 6.8 ($p < 0.05$). Initially, spheroids in acidic medium showed lower OD ($p < 0.001$), but this difference decreased after 72 hours. However, histological processing of these spheroids was hindered by their tendency to disaggregate. In the co-culture system, there was higher secretion of IFN γ in acidic medium ($p > 0.05$). IFN γ was not detected in SCC25 or T cells cultured alone at pH 7.4 or 6.8. IL-2 levels increased in SCC25 cells at pH 6.8, although not statistically significant; IL-2 was not detected in T cells at neutral or acidic pH. Overall, findings from this study underscore the influence of TME acidity on evasion of immune response by cancer cells and progression of oral squamous cell carcinoma, diminishing viability and function of T cells.

Keywords: Oral cancer; tumor acidity; immune response; T cells; IL-2; TNF-alpha; interferon-gamma; PD-L1; PD-1.

LISTA DE ABREVIATURAS

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA – Instituto Nacional de Câncer
CEC – Carcinoma Espinocelular
SCC25 – Linhagem celular de Carcinoma Espinocelular Bucal
IFN γ – Interferon-gama
IL-2 – Interleucina-2
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
MT – Microambiente Tumoral
CAFs – Fibroblastos Estromais Associados ao Câncer
Gln – Glutamina
TECs – Células Endoteliais Tumorais
VEGF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
UPR – Unfolded Protein Response
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
NK – Natural Killer
M1 – Macrófagos Tipo 1
LPS – Lipossacarídeos Bacterianos
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Monócitos Granulares
Th1 – Células T CD4+ do Tipo 1
IL – Interleucina
APCs – Células Apresentadoras de Antígenos
Tregs – Linfócitos T Reguladores
CRT – Calreticulina
MEC – Matriz Extracelular Tumoral
CAR – Receptor de Antígeno Quimérico
CTLs – Linfócitos T Citóxicos
ICIs – Inibidoras de Checagem Imunológica
TILs – Linfócitos Infiltrantes de Tumor
TEM – Transição Epitélio Mesênquima
Fig – Figura
GLOBOCAN – Observatório Global de Câncer

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....	9
1.1 CARCINOGENESE BUCAL.....	9
1.2 ACIDEZ TUMORAL.....	11
1.3 RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL.....	16
1.4 IMPACTO DA ACIDEZ TUMORAL SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	21
1.5 A APLICABILIDADE DA IMUNOTERAPIA.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

1.1 CARCINOGENESE BUCAL

Considerado um problema de saúde pública, o câncer é uma das principais causas de morte da população mundial. No ano de 2022 a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) estimou através do Observatório Global de Câncer (GLOBOCAN) a ocorrência de 389.846 novos casos e 188.438 óbitos por câncer de boca no mundo. De acordo com os últimos dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número estimado de novos casos de câncer da cavidade oral no Brasil, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 15.100 casos, correspondendo ao risco estimado de 6,99 por 100 mil habitantes, sendo 10.900 em homens e 4.200 em mulheres (BRAY et al., 2024; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2023).

O carcinoma espinocelular (CEC) bucal está entre os tipos mais comuns de neoplasias malignas que atingem a população brasileira, ocupando o oitavo entre os tipos de câncer mais frequentes, tendo maior prevalência nos indivíduos do sexo masculino. As taxas de incidência e mortalidade variam entre países e as diferenças entre incidência e mortalidade estão relacionadas aos seus níveis de renda e desenvolvimento. Países com renda alta tendem a ter taxas ajustadas de mortalidade menores, apesar de suas taxas de incidência serem elevadas, como ocorre nos Estados Unidos, no Canadá e na Austrália. Nas regiões com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) médio e baixo, como no Sudeste Asiático e Europa Ocidental, por exemplo, esse tipo de câncer supera os cânceres de cólon e reto e representa o terceiro mais frequente na população masculina (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2023; SUNG et al., 2021).

O CEC bucal possui como fatores de risco o hábito de fumar, o consumo excessivo de álcool e também a infecção por subtipos de papilomavírus humano de alto risco (LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018). Dessa forma, o perfil epidemiológico dos indivíduos acometidos pelo câncer oral está bem estabelecido na literatura. A doença acomete com maior frequência homens, com mais de 40 anos, tabagistas, de baixa renda e escolaridade. A língua é o sítio anatômico mais acometido (fig. 1), e o CEC bucal, também chamado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, é o tipo histológico mais frequente (fig. 2)

(RUTKOWSKA et al., 2020). O diagnóstico do câncer de boca ocorre mais comumente em estágios avançados da doença e na maioria dos casos se faz necessária uma abordagem terapêutica interdisciplinar que consiste em cirurgia, radioterapia, quimioterapia e, mais recentemente, imunoterapia combinados (SEGAL et al., 2019). Apesar dessa abordagem altamente agressiva, que muitas vezes diminui a qualidade de vida do paciente, uma alta incidência de resistência ao tratamento resulta em recorrência loco-regional ou estabelecimento de metástases à distância (CITRON et al., 2017; XIE; O'NEILL; PAN et al., 2017).



Figura 1 - Aspecto clínico de lesão de carcinoma espinocelular bucal em bordo lateral/ventre de língua. Úlcera de bordos elevados e endurecidos. Fonte: FO-UFRGS, 2023.

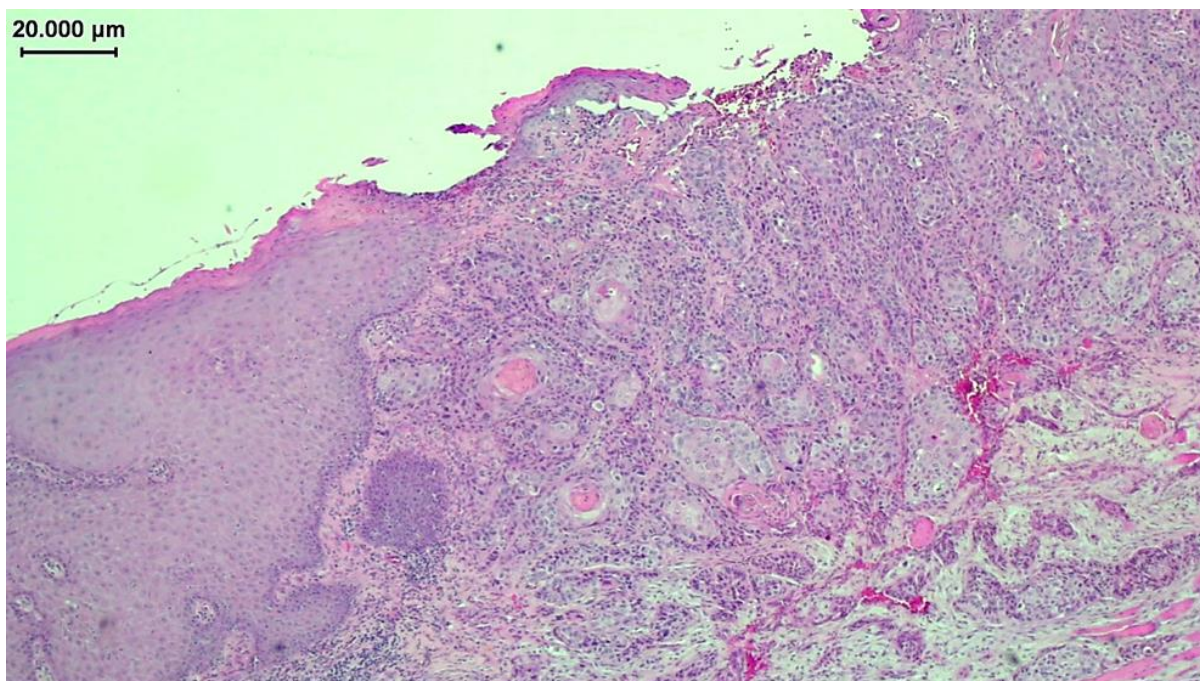


Figura 2 – Corte histológico de lesão de carcinoma espinocelular bucal apresentando ilhas de epitélio escamoso neoplásico invadindo o tecido conjuntivo. No interior das ilhas observa-se a formação de pérolas de ceratina (coloração HE, ampliação 200 ×, escala = 20um). Fonte: FO-UFRGS, 2023.

Uma das razões para o fracasso do tratamento do CEC é a alta complexidade desta doença, que é definida não só por um conjunto de células tumorais geneticamente modificadas, mas também pela existência de um microambiente tumoral (MT). Nessa concepção, o tumor é visto como um sistema em que há interações mútuas entre as células tumorais e seu estroma, envolvendo fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imunológico, além de um conjunto de alterações metabólicas. Através da interação com as células tumorais, o componente estromal contribui para promover o crescimento e a progressão do tumor e para modular a resposta ao tratamento (GILLIES et al., 2002; HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.2 ACIDEZ TUMORAL

As células tumorais frequentemente alteram seu metabolismo energético, reduzindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) através da fosforilação oxidativa, optando pela via

glicolítica mesmo em condições de oxigenação adequada. Essa mudança inicialmente é desencadeada pela falta transitória de oxigênio e nutrientes nas regiões hipovasculares da massa tumoral, resultando em hipóxia (YAN et al., 2024). Em estágios avançados do tumor, células mutadas catalisam o ácido pirúvico em ácido lático, persistindo na via glicolítica, fenômeno conhecido como "glicólise aeróbica" (fig. 3), descrito inicialmente por Otto Warburg e colaboradores na década de 1920 (WARBURG; WIND; NEGELEIN, 1927). Assim, os tumores absorvem quantidades significativas de glicose em comparação com o tecido circundante. A secreção de íons hidrogênio e lactato resultante dessa mudança metabólica contribui para a acidificação substancial do meio extracelular e consequente alteração do MT (CORBET; FERON, 2017; DA SILVA et al., 2018; KIM; BAEK, 2021; LIBERTI; LOCASALE, 2016; YANG; HU; MO, 2019).

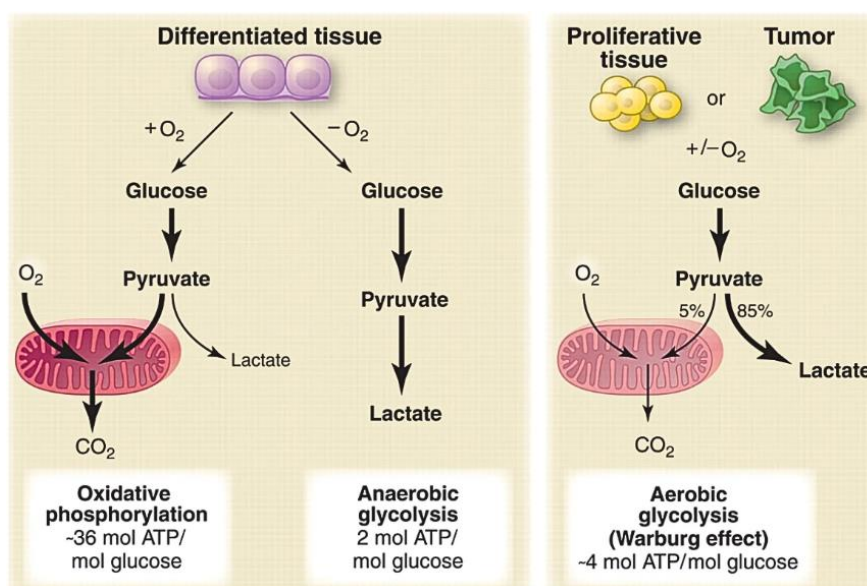


Figura 3: As diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (efeito Warburg) são demonstradas nesta imagem. Células diferenciadas metabolizam glicose em piruvato via glicólise, oxidando-o completamente na mitocôndria em presença de oxigênio, produzindo CO₂. Em condições de oxigênio limitado, o piruvato é convertido em lactato (glicólise anaeróbica), permitindo a continuidade da glicólise, mas gerando menos ATP. Células cancerosas frequentemente utilizam glicólise aeróbica, convertendo glicose em lactato mesmo com oxigênio presente. Essa adaptação é comum em tecidos proliferativos normais. Embora a fosforilação oxidativa permaneça funcional, a eficiência de ATP da glicólise aeróbica é inferior, com cerca de 10% da glicose desviada para vias biossintéticas antes da produção de piruvato. Fonte: VANDER HEIDEN et al., 2009.

O MT apresenta um conjunto de condições metabólicas que são conhecidas por serem afetadas por múltiplas variáveis, como interações célula a célula, disponibilidade distinta de oxigênio e nutrientes, além de uma mudança no suprimento vascular (KAYMAK et al., 2021). Adicionalmente, diferentes células do estroma participam consideravelmente de fenômenos relacionados à progressão tumoral (fig. 4). Os fibroblastos estromais associados ao câncer (CAFs) desempenham um papel crucial, fornecendo combustíveis mitocondriais como lactato, corpos cetônicos, acil-CoA e glutamina (Gln), às células tumorais. Por outro lado, as células imunes, como os linfócitos, podem liberar espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio para atacar diretamente as células tumorais. As células endoteliais tumorais (TECs) absorvem glicose e a fornecem às células tumorais, enquanto as macrófagos envolvidos na formação do microambiente tumoral são chamados de macrófagos associados ao tumor (TAMs) e provêm principalmente de células mononucleares circulantes do sangue. Além disso, os TAMs são influenciados pelo lactato exportado pelas células tumorais, contribuindo para a invasão e metástase de tumores uma vez que participam da angiogênese, eliminação de debris celulares, remodelamento tecidual e imunossupressão, proporcionando um ambiente propício para a proliferação do tumor. Essa competição por nutrientes, como glicose, ácidos graxos e aminoácidos resulta no microambiente tumoral, que quando associado à hipóxia induzida pela falta de vasos sanguíneos normais e à glicólise aumentada se torna ácido, leva à supressão do sistema imunológico e promove o crescimento do tumor (BRAND et al., 2016; KOUIDHI et al., 2016; MYERS; MILLER, 2021; SHI et al., 2022; WAN et al., 2022).

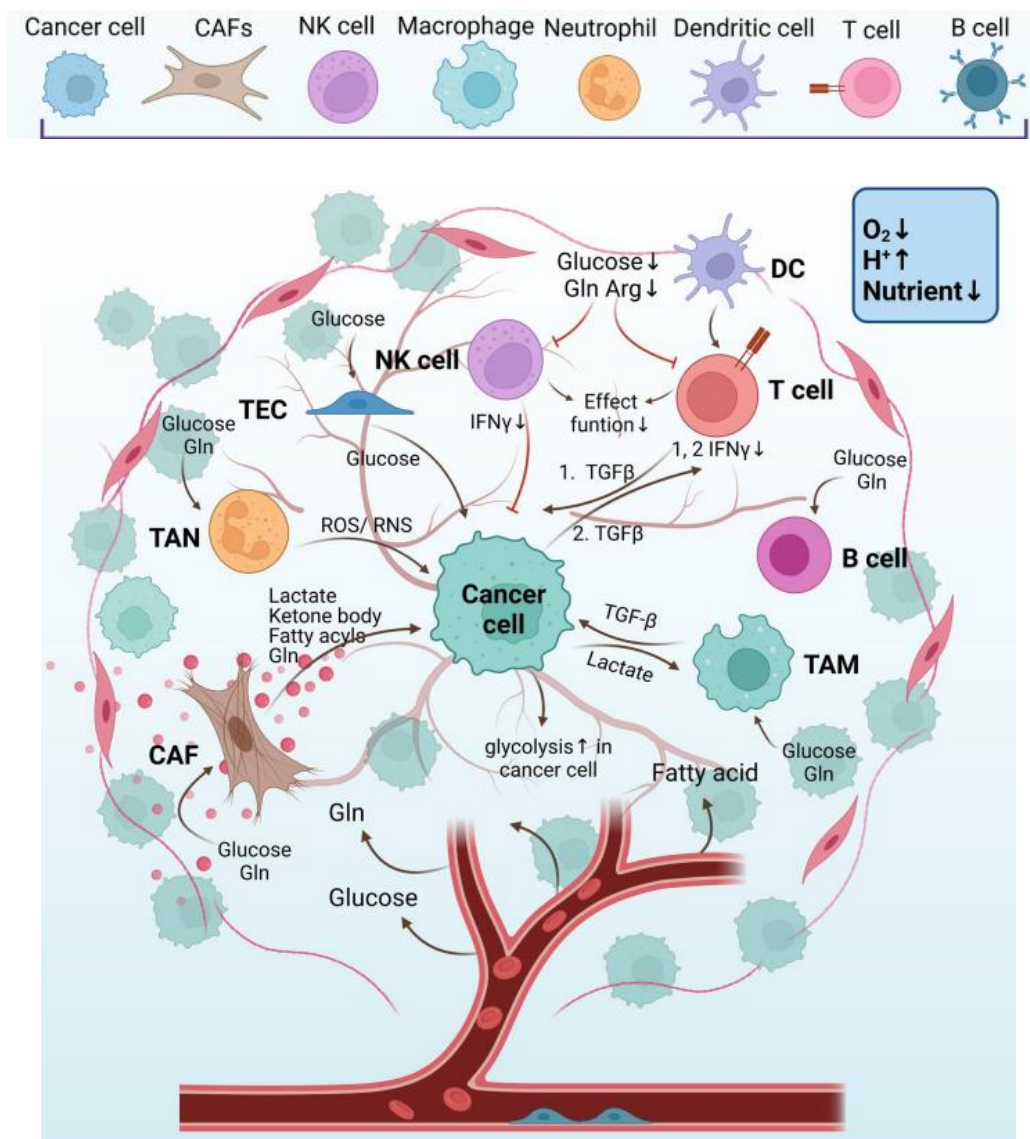


Figura 4 - Desenho esquemático de um tumor sólido demonstrando os componentes microambiente tumoral. Ressalta-se o baixo aporte de oxigênio, nutrientes e glicose seguidos de elevadas concentrações de íons H^+ e lactato. Fonte: SHI et al., 2022.

O pH extracelular em tumores sólidos é frequentemente reduzido (fig. 5), com valores oscilando entre 6,2 e 6,9, substancialmente inferiores aos níveis fisiológicos dos tecidos (~pH 7.4) devido à excreção contínua de lactato e à baixa excreção dos íons gerados. No entanto, as células tumorais mantêm o seu pH intracelular alcalino super-regulando transportadores de membrana, o que promove um estado de proliferação descontrolada das células tumorais (PEPPICELLI et al., 2017; IBRAHIM HASHIM et al., 2011; YANG; HU; MO, 2019). O microambiente ácido pode destruir a adesão entre as células tumorais, induzir a transição

mesenquimal epitelial (TEM) e promover a degradação da matriz extracelular tumoral (MEC), que desempenha um papel importante no processo de invasão e migração das células tumorais, favorecendo a progressão tumoral. Nesse contexto, o ambiente ácido estabelece condições adversas que resultam em danos irreversíveis ou morte celular, afetando tanto as células do sistema imunológico quanto as células tumorais sensíveis. Em contrapartida, as células tumorais capazes de tolerar esse estresse ácido demonstram maior agressividade, adaptando-se à pressão seletiva induzida pela acidez extracelular (ALLISON; COOMBER; BRIDLE, 2017; ZHANG et al., 2024). Esses processos de adaptação ao MT hostil são agressivos e exercem efeitos duradouros sobre o fenótipo das populações celulares sobreviventes, além de impactarem significativamente na resposta imunológica do organismo frente aos tumores. Estudos anteriores documentaram uma série de mudanças fenotípicas que ocorrem durante a adaptação das células tumorais ao ambiente ácido, dentre as quais se destacam o aumento no acúmulo de proteínas lisossômicas na membrana plasmática, a presença de atividade autofágica crônica, o crescimento de uma subpopulação de células pouco diferenciadas e pluripotentes, que exibem características semelhantes às células-tronco, além de uma maior agressividade e capacidade invasiva das células (ALLISON; COOMBER; BRIDLE, 2017; AVNET et al., 2017; DAMAGHI et al., 2015; DAMAGHI; GILLIES, 2016; PRUNES et al., 2022; SADEGHI et al., 2020; WOJTKOWIAK et al., 2012).

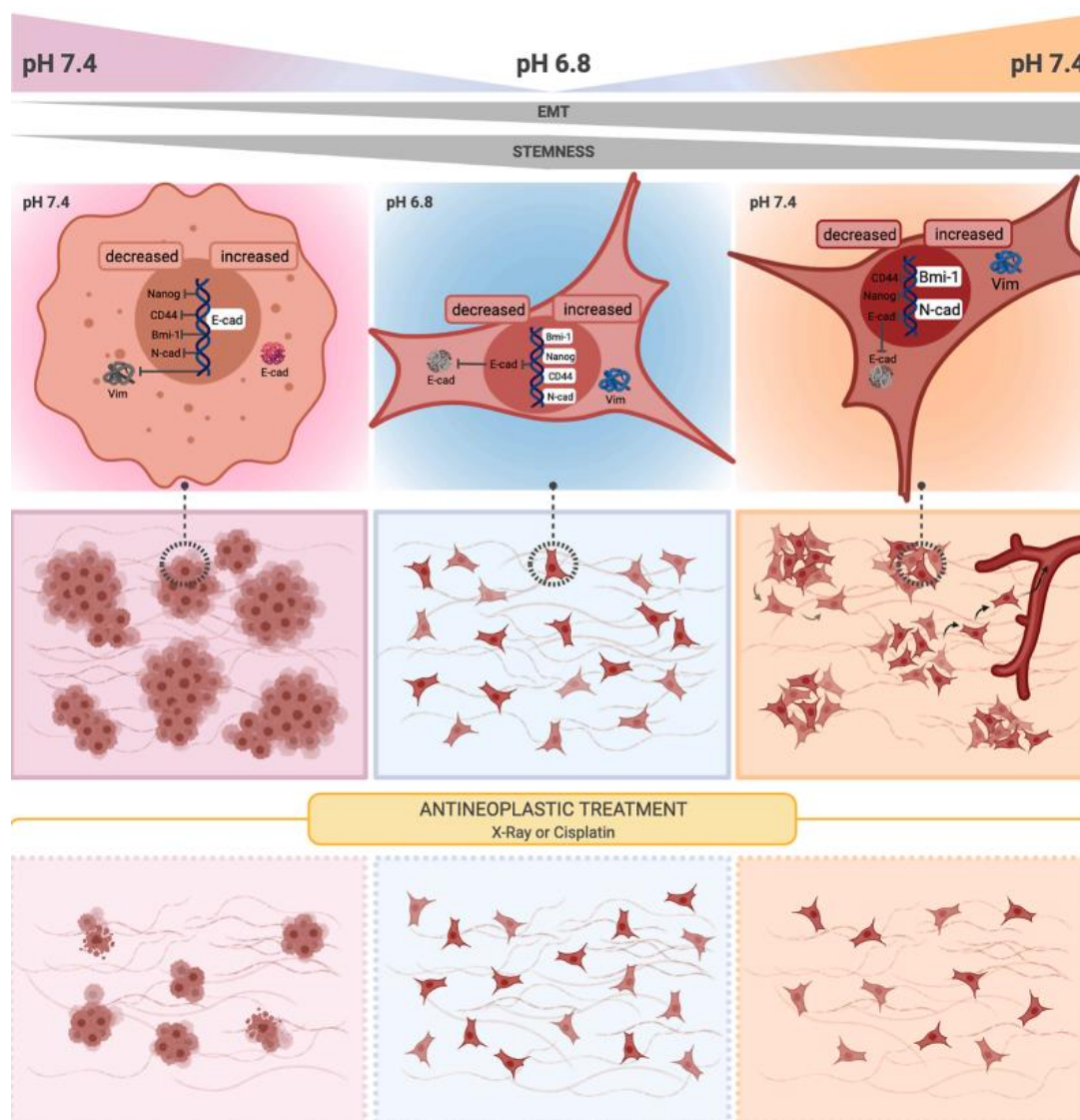


Figura 5 - Padrão molecular e fenotípico de células do CEC bucal de acordo com o pH extracelular antes e após o tratamento antineoplásico. O microambiente ácido causa um processo de adaptação celular, uma vez que reduz a viabilidade das células cancerígenas, seguida de alterações fenotípicas, comportamentais e moleculares. Fonte: PRUNES et al., 2022.

1.3 RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL

Durante o processo de crescimento tumoral, uma variedade de mecanismos de defesa do hospedeiro pode ser acionada, visando impedir a proliferação e progressão das células que apresentam danos significativos ao seu material genético. Entre as estratégias proeminentes estão os mecanismos inerentes às células, como a indução de morte celular programada em células tumorais em estágios iniciais. Além disso, o sistema imunológico desempenha um papel

crucial como uma linha de defesa importante contra o câncer e, nesse contexto, as imunoterapias têm surgido como uma nova e promissora opção para o tratamento (RAHMAN et al., 2023; WEINBERG, 2013). Com o avanço das técnicas e a identificação de marcadores imunológicos distintos, foi observada uma heterogeneidade na densidade do infiltrado inflamatório nos tumores sólidos, sugerindo uma resposta potencialmente antitumoral do sistema imune contra as células malignas, permitindo assim que o sistema imunológico do hospedeiro detecte e tente eliminar células tumorais. Esse achado ressalta a complexidade das interações entre o sistema imunológico e as células neoplásicas, conforme evidenciado em estudos anteriores (HANAHAN; WEINBERG, 2011; PAGÈS et al., 2010).

No início do século XIX, o pesquisador Paul Ehrlich propôs a hipótese de que uma das funções do sistema imunológico seria resistir ou erradicar o desenvolvimento e a progressão de tumores, desde estágios iniciais até micrometástases avançadas. No entanto, essa hipótese não foi avaliada experimentalmente, em grande parte devido à limitação do conhecimento e das técnicas disponíveis na época para estudar o sistema imunológico (EHRlich, 1908). Após alguns anos, com o avanço dos conhecimentos em imunologia, Burnet e outros pesquisadores formularam a teoria de que populações de células tumorais eram regularmente eliminadas pelos linfócitos, impedindo a formação de tumores e estabelecendo o conceito de imunovigilância no contexto do câncer (BURNET, 1957, 1964, 1971).

Um conjunto crescente de estudos recentes, incluindo pesquisas com animais geneticamente modificados e investigações epidemiológicas, sugere que o sistema imunológico desempenha um papel crucial na prevenção do estabelecimento e progressão de tumores. Comparando tumores induzidos em animais com resposta imune deficiente com animais imunocompetentes, observa-se uma maior incidência e crescimento mais rápido dos tumores nos animais com imunidade comprometida. Além disso, em pacientes com câncer de cólon, ovário e melanoma, foi observado um prognóstico mais favorável em casos em que há uma alta densidade de linfócitos T citotóxicos e células Natural Killer (NK) infiltradas nos tumores (DANESHMANDI; WEGIEL; SETH, 2019; LEONE; POWELL, 2020; NELSON, 2008; OSTRAND-ROSENBERG, 2008; PAGÈS et al., 2010).

Nessa perspectiva, a partir do desenvolvimento dos tumores as células neoplásicas ou uma fração delas adquirem a capacidade de escapar da vigilância contínua exercida pelos diversos componentes do sistema imunológico. A dificuldade enfrentada pelo sistema imune em identificar as células tumorais reside no fato de que ele é projetado para eliminar agentes

estranhos ao organismo. Portanto, o reconhecimento de células nativas do organismo, mesmo que modificadas, representa um desafio para o hospedeiro. Embora a detecção e eliminação de clones celulares neoplásicos altamente imunogênicos ocorram regularmente, parece que populações de clones com baixo potencial imunogênico não são identificadas e, conseqüentemente, proliferam, contribuindo para o estabelecimento de massas tumorais sólidas (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Este processo, conhecido como imunoedição, é um fenômeno que ocorre no contexto do câncer e é composto por três estágios distintos: eliminação, equilíbrio e evasão. Na fase de eliminação, ocorre a vigilância imunológica contra o câncer, na qual as células tumorais são identificadas e eliminadas pelo sistema imunológico. O estágio de equilíbrio representa um período de latência após a destruição parcial das células tumorais, com apenas a sobrevivência de uma subpopulação altamente imunogênica. Por fim, a fase de evasão é caracterizada pela expansão de clones celulares menos imunogênicos, que conseguiram evitar o reconhecimento pelo sistema imunológico nas fases anteriores (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

As células do sistema imune são divididas em duas categorias: células imunes inatas e adaptativas. As células imunes inatas incluem células NK, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, enquanto as células imunes adaptativas consistem em células T. As células T CD4+, células citotóxicas, T CD8+ e as células NK são reconhecidas como os principais efetores na eliminação de células tumorais e desempenham um papel essencial na resposta imune antitumoral. Essas células são, em última instância, responsáveis pela etapa final do processo de regulação imunológica dos cânceres: reconhecer e eliminar as células tumorais. Elas executam essa tarefa por meio de dois processos principais. A mais bem descrita é a secreção da proteína formadora de poros perforina, que permite que granzimas co-secretadas entrem na célula-alvo e induzem a apoptose. Além disso, essas células estão associadas à memória imunológica, o que contribui para evitar tanto a recidiva tumoral, quanto o estabelecimento de metástases (MYERS; MILLER et al., 2021; OSTRAND-ROSENBERG, 2008; VOSKIBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015).

Os linfócitos T citotóxicos (CTLs) que expressam CD8+ são descritos como um dos principais responsáveis pela morte das células tumorais (LEFLER; MANOBIANCO; BASHIR et al., 2024). Sua função primordial reside na detecção e destruição direta de células malignas mediada pela interação com antígenos presentes no Complexo de Histocompatibilidade de Classe I (MHC I), resultando na indução de apoptose celular por meio de vias como a interação

do sistema de reconhecimento Fas-FasL ou pela secreção de agentes citotóxicos, tais como as proteínas perforinas e enzimas granzimas, ambas atuantes na defesa do organismo (COHEN; BLASBERG, 2017; WEINBERG, 2013). Outro mecanismo que leva à destruição das células tumorais por meio dos linfócitos T CD8⁺ é a secreção de interferon-gama (IFN γ), a qual estimula a enzima ASCL4 a alterar o padrão de metabolismo lipídico das células malignas e sua combinação com ácido araquidônico (AA) pode induzir ferroptose dessas células, ou seja, danos lipídicos catalisados por ferro que desempenham papel significativo na supressão do desenvolvimento carcinogênico (LIAO et al., 2022; ZHANG et al., 2024).

Durante a progressão tumoral os macrófagos do tipo 1 (M1) são ativados por estímulos como interferon-gama (IFN- γ), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator estimulador de colônias de monócitos granulócitos (GM-CSF). Essas células desempenham um papel crucial na eliminação de células tumorais por meio da liberação de óxido nítrico e outros mediadores químicos. Além disso, os macrófagos M1 são capazes de promover e estimular a resposta citotóxica de linfócitos T CD8⁺, apesar de essas células terem sua expressão dos marcadores de ativação diminuída em um MT ácido (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; JIN et al., 2019; OSTRAND-ROSENBERG, 2008). Esses linfócitos são responsáveis por dificultar o desenvolvimento tumoral, atuando diretamente sobre as células tumorais através da detecção e induzindo sua apoptose, promovendo um desfecho clínico favorável ao indivíduo (COHEN; BLASBERG, 2017; NELSON, 2008; WEINBERG, 2013).

As células T CD4⁺ do tipo 1 (Th1), quando ativadas pela interleucina-12 (IL-12), desempenham uma função antitumoral significativa, contribuindo para a estabilização ou regressão do tumor em desenvolvimento. Adicionalmente, essas células promovem a ativação das células T citotóxicas CD8⁺, facilitando, assim, a eliminação das células tumorais (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; OSTRAND-ROSENBERG, 2008; ZHANG et al., 2024). Além disso, a regulação da vigilância imune ocorre mediante a secreção de citocinas pelas células Th1. Quando ativadas, essas células liberam mediadores químicos, incluindo IFN γ , TNF- α , interleucina-2 (IL-2) e IL-12. Essas citocinas reguladoras estão intimamente ligadas ao processamento e apresentação de antígenos pelo MHC de classe I e II em células apresentadoras de antígenos (APCs), que por sua vez influenciam na magnitude e duração da resposta citotóxica dos linfócitos T contra células neoplásicas. A secreção de IFN γ pelas células Th1 ocorre em resposta à estímulos nocivos e promove a polarização de macrófagos, além de induzir a morte direta das células tumorais. Portanto, as respostas das células Th1 podem atuar

tanto diretamente quanto indiretamente na inibição do desenvolvimento do câncer, uma vez que a infiltração estromal de células CD4+ está significativamente associada à melhor sobrevida dos indivíduos com CEC (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; OSTRANDROSENBERG, 2008; LEQUERICA-FERNÁNDEZ et al., 2021; ZHANG et al., 2024).

As células NK apresentam a habilidade de reconhecer proteínas de superfície ligadas ao estresse celular, bem como de detectar células tumorais que tenham reduzido a expressão do MHC I. Esse reconhecimento leva à ativação de uma resposta citotóxica pelas células NK (RENNER et al., 2019; WEINBERG, 2014). Um reforço na resposta antitumoral mediada por células NK é observado devido à superexpressão de receptores NK e seus ligantes nas células tumorais. Esse aumento na expressão é desencadeado pela presença de IL-12 e IFN γ secretados pelas células Th1. Dessa forma, a atividade antitumoral tanto dos macrófagos quanto das células NK parece ser amplificada pela presença de células Th1 (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; ZHANG et al., 2024).

Os linfócitos T incluem uma subpopulação conhecida como linfócitos T reguladores (Tregs), que desempenham um papel significativo na carcinogênese. Esses linfócitos, caracterizados pela expressão do marcador de superfície CD25 em altas concentrações, específico para a IL-2, são predominantemente da linhagem CD4+. Além disso, eles também são identificados pela presença do fator de transcrição Foxp3 como um marcador de linhagem. Embora geralmente associados a eventos que promovem a progressão tumoral, os linfócitos Tregs foram relacionados a prognósticos favoráveis e a um melhor controle local e regional em casos de carcinomas de cabeça e pescoço, bem como em outros tipos de tumores (PAGÈS et al., 2010). Nesse contexto, um conjunto crescente de evidências sugere que as células do sistema imunológico possuem papéis divergentes durante a instauração e progressão do câncer (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; RAHMAN et al., 2023). Por outro lado, a presença de um infiltrado inflamatório no local do tumor pode desempenhar um papel na manutenção de sinais proliferativos, sobrevivência celular, angiogênese, invasão e formação de metástases, através da liberação de citocinas. Além disso, o recrutamento de certas subclasses de células mielóides, como linfócitos, mastócitos, monócitos, granulócitos e macrófagos para o ambiente tumoral parece ser uma estratégia adotada pelas células tumorais para promover a carcinogênese quando expostas a estímulos específicos do microambiente (COLOTTA et al., 2009; DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; QIAN; POLLARD, 2010; RAHMAN et al., 2023; ZHANG et al., 2024).

1.4 IMPACTO DA ACIDEZ TUMORAL SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

As vantagens adaptativas resultantes das condições adversas do MT incluem a presença de lactato e a acidificação do compartimento extracelular, que estão correlacionadas com a disfunção das células do sistema imunológico. Isso enfraquece a imunovigilância, contribuindo, em última análise, para a consolidação de mecanismos de escape imunológico (ESTRELLA et al., 2013; GATENBY; GILLIES, 2004; HJELMELAND et al., 2011; MOELLERING et al., 2008; SMALLBONE et al., 2005; ZHANG; LI, 2020). Apesar desse consenso sobre a existência de um efeito de imunossupressão bem estabelecido causado pela acidose, uma ampla gama de mecanismos recentemente descobertos que participam neste processo foi descrita nos últimos anos (DAMAGHI et al., 2013; GIATROMANOLAKI et al., 2017, 2020; HUBER et al., 2017; LEFLER; MANOBIANCO; BASHIR et al., 2024; PILON-THOMAS et al., 2016). Não apenas a função citotóxica de vários imunócitos é comprometida, mas também há uma propensão ao aumento de células do sistema imunológico com potencial pró-tumoral, favorecendo assim as células neoplásicas malignas no processo de progressão tumoral (BOHN et al., 2018; ZHANG; LI, 2020).

A acidificação do MT tem a capacidade de suprimir a atividade antitumoral das células T, resultando na diminuição da produção de citocinas inflamatórias e na redução da capacidade citotóxica desse subtipo celular (BALGI et al., 2011). Clinicamente, essas características são convertidas em agressividade tumoral e pior prognóstico (BOHN et al., 2018; HO; LIU, 2016; LIU et al., 2019; ZHANG; LI, 2020). Em muitos casos, a resposta aos agentes oncoimunoterápicos não ocorre como esperado, sendo de curta duração ou ineficaz. Portanto, a elucidação de como os fatores biológicos inerentes ao microambiente de cada tumor influenciam a eficácia da imunoterapia é decisiva para alterar as taxas de sucesso desse tipo de tratamento.

Neste contexto, evidenciou-se que o lactato, um subproduto do metabolismo tumoral, tem a capacidade de promover a diferenciação de monócitos humanos em macrófagos M2. Esse processo é mediado, conforme descrito na literatura, pela via de sinalização ERK-STAT3 e pela ativação de receptores acoplados à proteína G, como o GPR132, encontrados na membrana celular dos macrófagos, os quais foram comprovadamente relacionados com a ativação do fenótipo M2 (CHEN et al., 2017; IPPOLITO et al., 2019). Além disso, o lactato que está amplamente presente no MT ainda exerce um efeito inibitório sobre as funções citolíticas clássicas das células NK, resultando no aumento da concentração de mielócitos imunossupressores, os quais são capazes de prejudicar o potencial citotóxico das células NK

(HUSAIN; SETH; SUKHATME, 2013). Além dos efeitos associados à redução da citotoxicidade em ambos os tipos celulares imunológicos, o lactato também resulta na diminuição da produção de IFN- γ , por meio da inativação do fator de transcrição ativado por calcineurina (NFAT) (PENG et al., 2016).

Nos linfócitos T, a elevada concentração de lactato no espaço extracelular induz um desequilíbrio osmótico que inibe o fluxo do metabólito para fora da célula, resultando em sua acumulação intracelular. Esse fenômeno conduz à redução da síntese de citocinas e à significativa deterioração das atividades citotóxicas desses linfócitos (FISCHER et al., 2007; XIA et al., 2017). Apesar de bem estabelecido na literatura, o efeito imunossupressor do MT compreende uma ampla gama de mecanismos que seguem sendo explorados e descritos ao longo das últimas décadas (DAMAGHI; WOJTKOWIAK; GILLIES, 2013; GIATROMANOLAKI et al., 2017, 2019; HUBER et al., 2017; PILON-THOMAS et al., 2016; RAHMAN et al., 2023).

1.5 A APLICABILIDADE DA IMUNOTERAPIA

A imunoterapia é um tratamento que busca fortalecer ou regularizar o sistema imune, fazendo com que o organismo tenha maior capacidade para combater infecções, câncer e doenças autoimunes. As terapias imunológicas para o tratamento do câncer têm despertado interesse tanto na comunidade científica quanto na população leiga. No entanto, diversos desafios ainda limitam sua aplicação em tumores sólidos. Notáveis avanços clínicos foram alcançados com os inibidores de checkpoints imunes em tumores imunologicamente "quentes", como melanoma, câncer de pulmão, carcinoma cutâneo de células escamosas e carcinoma de células renais. Enquanto isso, a eficácia das vacinas contra o câncer e das terapias com células T, como os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e as células T do receptor de antígeno quimérico (CAR), tem sido mais moderada, embora esta última tenha demonstrado sucesso particular em malignidades hematológicas (MIGUEL et al., 2021; WALDMAN; FRITZ; LENARDO, 2020).

A maioria das imunoterapias atualmente disponíveis e em fase experimental para o tratamento do câncer enfatiza a relevância abrangente da atividade antitumoral das células T. Isso decorre do fato de que os CTLs, que expressam o marcador CD8, são, em última instância, responsáveis pela fase terminal do processo de regulação imunológica dos tumores (LEFLER; MANOBIANCO; BASHIR, 2024). Além disso, o êxito de fármacos que inibem a interação

entre a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e seu ligante, a proteína de morte celular programada 1 ligante 1 (PD-L1), tem impulsionado avanços significativos no tratamento do câncer ao longo da última década. A Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos aprovou esses fármacos para o tratamento de subtipos específicos de câncer de pulmão, câncer renal, câncer de bexiga, melanoma, linfoma de Hodgkin e outros tipos de tumores, gerando um interesse considerável entre os pesquisadores ao redor do globo (ARMAND et al., 2021; BELLMUNT et al., 2017; DAASSI; MAHONEY; FREEMAN, 2020; MOTZER et al., 2015; SCHMID et al., 2018).

O gene PD-L1, localizado no cromossomo 9 humano, p24.1, é amplamente expresso em células tumorais. Em circunstâncias fisiológicas normais, a via PD-1/PD-L1 desempenha um papel crucial como mecanismo de autoproteção tecidual, mantendo a tolerância periférica. No entanto, quando o ligante PD-L1 presente nas células tumorais se liga ao receptor PD-1 nos linfócitos T, estes se tornam disfuncionais, resultando em um estado de imunossupressão. Os tumores adquirem uma condição de imunotolerância, facilitando o escape do sistema imunológico e permitindo a proliferação e invasão das células tumorais, que conseguem evitar o reconhecimento e a eliminação pelo sistema imune (JIANG et al., 2019; LIU et al., 2021; TÉGLÁSI et al., 2019; XU et al., 2021).

Nesse contexto, para certos tumores manifesta-se uma resistência primária às terapias imunológicas. Além dos mecanismos de resistência primária que impactam o paradigma imunológico convencional, como a apresentação de antígenos, a sinalização de citocinas, os pontos de checagem e a imunorregulação, há também a influência de mutações condutoras e mutações que conferem resistência às terapias imunológicas, uma reduzida propensão à morte de células tumorais imunogênicas, disfunções metabólicas e variações individuais na microbiota. Em tumores inicialmente responsivos a tratamentos direcionados ao sistema imunológico, adaptações à vigilância imunológica possibilitam a resistência secundária aos tratamentos atualmente disponíveis. Por exemplo, a resistência primária (inata) e secundária (adquirida) às Inibidoras de Checagem Imunológica (ICIs) pode ser categorizada em aspectos como a produção insuficiente de células T antitumorais, função inadequada dessas células T e comprometimento da memória das células T (LEFLER; MANOBIANCO; BASHIR, 2024; JENKINS; BARBIE; FLAHERTY, 2018).

No CEC bucal, a terapia com PD-1/PD-L1 é particularmente significativa. Isso se dá uma vez que a patogênese do CEC é altamente associada ao comprometimento imunológico, principalmente aos efeitos de respostas defeituosas de células T e citocinas supressoras. Além disso, o CEC também é considerado altamente imunossupressor devido à sua expressão de PD-

L1. Em segundo lugar, os TILs estão intimamente envolvidas na tumorigênese *in vivo*, o tecido do CEC está muito próximo do tecido linfóide e a infiltração de células imunes é uma das principais características do CEC (CHENG et al., 2024; MEEHAN et al., 2020; HIRAI et al., 2017; MANDAL et al., 2016).

Os avanços na compreensão dos processos e fatores relacionados à malignidade tumoral, provenientes da pesquisa nessa área, têm impacto direto na prática clínica, permitindo uma melhor avaliação dos prognósticos clínicos. Além disso, em relação às opções terapêuticas disponíveis atualmente, é reconhecido que, em muitos casos, a resposta aos agentes imunoterápicos é insatisfatória, especialmente no que diz respeito à eficácia e à manutenção dos efeitos antitumorais alcançados. Portanto, compreender os efeitos do MT ácido na resposta imune anti-tumoral é de fundamental importância para melhorar os resultados terapêuticos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a influência da acidez no microambiente tumoral do carcinoma espinocelular bucal sobre o fenótipo celular, desfechos de proliferação, morte celular, assim como sobre a resposta imune antitumoral de células T.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes condições experimentais relacionadas à acidez tumoral, comparando a exposição celular ao pH neutro e pH ácido, tanto de forma isolada quanto através do co-cultivo;
- Analisar a adaptação de células tumorais e de linfócitos T após a exposição ao microambiente tumoral ácido;
- Avaliar a influência das condições da acidez do microambiente tumoral sobre a secreção das citocinas inflamatórias IL-2 e IFN γ ;
- Verificar a influência das condições da acidez do microambiente tumoral sobre a expressão das moléculas de reconhecimento celular PD-1 e PD-L1, sabidamente envolvidas na resposta imunológica;
- Verificar a interação entre células de câncer oral e células T através da utilização de cultura 3D.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Análise da influência do microambiente tumoral ácido sobre a resposta imune no carcinoma espinocelular bucal

Manuscrito a ser submetido no periódico *Life Sciences*

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços na pesquisa sobre os processos e fatores que contribuem para a malignidade tumoral têm impacto significativo na prática clínica, melhorando a avaliação dos prognósticos e sendo crucial para aprimorar resultados terapêuticos. Além disso, é amplamente reconhecido que, em muitos casos, a eficácia e a manutenção dos efeitos antitumorais alcançados com agentes imunoterápicos são insatisfatórios. Levando em consideração a relevância do tema, o presente estudo se propôs a investigar a influência do MT ácido sobre a resposta imune no CEC bucal. Para esse fim, desenvolvemos um modelo *in vitro* simulando o pH extracelular do MT, no intuito de reproduzir as condições observadas em tumores sólidos.

Com o desenvolvimento deste estudo visualizamos mecanismos importantes que atuam diretamente na resposta imune antitumoral do organismo frente aos tumores sólidos, no entanto, deve-se ter cautela ao extrapolar estes resultados para a prática clínica. Devemos considerar que estes resultados são achados de experimentos *in vitro*, nos quais as células, mesmo que cultivadas em condições ótimas de sobrevivência para este ambiente, não representam a complexidade e a heterogeneidade que vimos na prática clínica de um indivíduo, visto que não estão expostas aos estímulos e interações que ocorrem no organismo humano.

Futuras pesquisas com modelos mais complexos, pré-clínicos e clínicos que mimetizam mais rigorosamente a funcionalidade destes sistemas devem explorar intervenções terapêuticas que visem neutralizar ou reverter a acidificação do MT como estratégia para potencializar a resposta imune antitumoral, melhorando os resultados clínicos e imunoterápicos no tratamento de pacientes com câncer de boca. Em suma, a investigação dos efeitos do pH ácido no MT oferece percepções valiosas para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras e direcionadas, com o objetivo de combater a evasão imune e melhorar a sobrevida de indivíduos com câncer.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. The Surprising Story of IL-2: From Experimental Models to Clinical Application. *Am J Pathol.* 190(9):1776-1781, 2020.

ALLISON, K. E; COOMBER, B. L; BRIDLE, B. W. Metabolic reprogramming in the tumour microenvironment: a hallmark shared by cancer cells and T lymphocytes. *Immunology*, [s. l.], v. 152, n. 2, p. 175–184, 2017.

ANGELIN, A et al. Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell metabolism*, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1282–1293.e7, 2017.

ARMAND, P et al. A phase 1b study of dual PD-1 and CTLA-4 or KIR blockade in patients with relapsed/refractory lymphoid malignancies. *Leukemia.* 35(3):777–786, 2021.

AVNET, S et al. Altered pH gradient at the plasma membrane of osteosarcoma cells is a key mechanism of drug resistance. *Oncotarget*, [s. l.], v. 7, n. 39, p. 63408–63423, 2016.

AVNET, S et al. Cancer-associated mesenchymal stroma fosters the stemness of osteosarcoma cells in response to intratumoral acidosis via NF- κ B activation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, [s. l.], v. 140, n. 6, p. 1331–1345, 2017.

BALGI, A. D et al. Regulation of mTORC1 signaling by pH. *PloS one*, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e21549, 2011.

BECELLI, R et al. Intracellular and Extracellular Tumor pH Measurement in a Series of Patients With Oral Cancer. *Journal of Craniofacial Surgery* 18(5):p 1051-1054, 2007.

BELLMUNT, J et al. Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 376(11):1015–1026, 2017.

BEROD, L et al. De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat. Med.* 20, 1327–1333, 2014.

BOEDTKJER, E; PEDERSEN, S. F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu Rev Physiol.* 82:103-126, 2020.

BÖHME, I; BOSSERHOFF, A. Extracellular acidosis triggers a senescence-like phenotype in human melanoma cells. *Pigment cell & melanoma research*, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 41–51, 2020.

BOHN, T et al. Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages. *Nature immunology*, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1319–1329, 2018.

BURNET, M. Cancer - A Biological Approach. *British medical journal*, [s. l.], v. 1, n. 5023, p. 841–847, 1957.

BURNET, M. Immunological factors in the process of carcinogenesis. *British medical bulletin*, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 154–158, 1964.

BURNET, F. M. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplantation reviews*, [s. l.], v. 7, p. 3–25, 1971.

BRAND, A et al. LDHA-Associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells. *Cell Metab.* 24(5):657–671, 2016.

BRAY, F et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 74(3):229-263, 2024.

BROWN, J. M; WILSON, W. R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature reviews. Cancer*, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 437–447, 2004.

CALCINOTTO, A et al. Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res.* 72, 2746–2756, 2012.

CERTO, M et al. Lactate modulation of immune responses in inflammatory versus tumour microenvironments. *Nat Rev Immunol.* 21(3):151-161, 2021.

CHEN, P et al. Gpr132 sensing of lactate mediates tumor-macrophage interplay to promote breast cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 580–585, 2017.

CHENG, Y et al. Molecular basis, potential biomarkers, and future prospects of OSCC and PD-1/PD-L1 related immunotherapy methods. *Heliyon.* 10(4):e25895, 2024.

CHUI, M. H. Insights into Cancer Metastasis from a Clinicopathologic Perspective: Epithelial-Mesenchymal Transition Is Not a Necessary Step. *Int. J. Cancer.* 132:1487–1495, 2013.

CITRON, F. et al. An Integrated Approach Identifies Mediators of Local Recurrence in Head and Neck Squamous Carcinoma. 3769–81, 2017.

COHEN, I. J; BLASBERG, R. Impact of the Tumor Microenvironment on Tumor-Infiltrating Lymphocytes: Focus on Breast Cancer. *Breast cancer: basic and clinical research*, [s. l.], v. 11, p. 1178223417731565, 2017.

COLOTTA, F et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 1073–1081, 2009.

CORBET, C; FERON, O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat. Rev. Cancer* 17, 577–593, 2017.

DAASSI, D; MAHONEY, K. M; FREEMAN, G. J. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. *Nat. Rev. Immunol.* 20(4):209–215, 2020.

DAI, Z et al. In situ forming pH/ROS-responsive niche-like hydrogel for ultrasound-mediated multiple therapy in synergy with potentiating anti-tumor immunity. *Mater. Today.* 65, 62– 77, 2023.

DAMAGHI, M; WOJTKOWIAK, J. W; GILLIES, R. J. pH sensing and regulation in cancer. *Frontiers in physiology*, [s. l.], v. 4, p. 370, 2013.

DAMAGHI, M et al. Chronic acidosis in the tumour microenvironment selects for overexpression of LAMP2 in the plasma membrane. *Nature communications*, [s. l.], v. 6, p. 8752, 2015.

- DAMAGHI, M; GILLIES, R. J. Lysosomal protein relocation as an adaptation mechanism to extracellular acidosis. *Cell cycle* , [s. l.], v. 15, n. 13, p. 1659–1660, 2016.
- DAMAGHI, M; GILLIES, R. J. Phenotypic changes of acid-adapted cancer cells push them toward aggressiveness in their evolution in the tumor microenvironment, *Cell Cycle*. 1739–1743, 2017.
- DANESHMANDI, S; WEGIEL, B; SETH, P. Blockade of Lactate Dehydrogenase-A (LDH-A) Improves Efficacy of Anti-Programmed Cell Death-1 (PD-1) Therapy in Melanoma. *Cancers (Basel)*. 11(4):450, 2019.
- DA SILVA, V. P et al. Effects of extracellular acidity on resistance to chemotherapy treatment: a systematic review. *Medical oncology* , [s. l.], v. 35, n. 12, p.161, 2018.
- DENARDO, D. G; ANDREU, P; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer metastasis reviews*, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 309–316, 2010.
- DOMINGUES, P et al. Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas. *Brain Behav Immun*, 53:1–15, 2016.
- DONGRE, A et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Immunosuppression in Breast Carcinomas. *Cancer Res*. 77:3982–3989, 2017.
- DUNN, G. P; OLD, L. J; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 22:329-60, 2004.
- EHRlich, P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. [S. l.: s. n.], 1908.
- EL-NAGGAR, A. K et al. WHO Classification of Head and Neck Tumours, IARC Who Classification of Tum, 2020.
- ESTRELLA, V et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer research*, [s. l.], v. 73, n. 5, p. 1524–1535, 2013.
- FEDERICI, C et al. Exosome Release and Low pH Belong to a Framework of Resistance of Human Melanoma Cells to Cisplatin. *PloS one*, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e88193, 2014.
- FISCHER, K et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, [s. l.], v. 109, n. 9, p. 3812–3819, 2007.
- GATENBY, R. A; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature reviews. Cancer*, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 891–899, 2004.
- GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 56–61, 2008.
- GIATROMANOLAKI, A et al. Thermogenic protein UCP1 and UCP3 expression in non-small cell lung cancer: relation with glycolysis and anaerobic metabolism. *Cancer biology & medicine*, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 396–404, 2017.

GIATROMANOLAKI, A et al. Programmed death-1 receptor (PD-1) and PD-ligand-1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer and the immune-suppressive effect of anaerobic glycolysis. *Medical oncology*, [s. l.], v. 36, n. 9, p. 76, 2020.

GIATROMANOLAKI, A et al. Expression of CD47 and SIRP α Macrophage Immune-Checkpoint Pathway in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 14(7):1801, 2022.

GILLIES, R. J et al. Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. *Neoplasia*. 1:197–207, 1999.

GILLIES, R. J et al. MRI of the tumor microenvironment. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 430–450, 2002.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S et al. Epithelial Mesenchymal Transition and Immune Response in Metaplastic Breast Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 22(14):7398, 2021.

GOTTFRIED, E et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*, [s. l.], v. 107, n. 5, p. 2013–2021, 2006.

GRIVENNIKOV, S. I; GRETEN, F R; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, [s. l.], v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GROUSSARD, C et al. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *Journal of applied physiology*, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 169–175, 2000.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANIF, F et al. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 18(1):3-9, 2017.

HERRERA, F. G; BOURHIS, J; COUKOS, G. Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice. *CA: a cancer journal for clinicians*, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 65–85, 2017.

HIRAI, M et al. Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment. *Int. J. Oncol*. 50(1):41–48, 2017.

HJELMELAND, A. B et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell death and differentiation*, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 829–840, 2011.

HO, P. C; LIU, P. S. Metabolic communication in tumors: a new layer of immunoregulation for immune evasion. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 4, 1–9, 2016.

HUBER, V et al. Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Seminars in cancer biology*, [s. l.], v. 43, p. 74–89, 2017.

HUSAIN, Z; SETH, P; SUKHATME, V. P. Tumor-derived lactate and myeloid-derived suppressor cells: Linking metabolism to cancer immunology. *Oncoimmunology*, [s. l.], v. 2, n. 11, p. e26383, 2013.

IBRAHIM HASHIM, A et al. Reduction of metastasis using a non-volatile buffer. *Clinical & experimental metastasis*, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 841–849, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) - Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa de 2023: incidência de câncer da cavidade oral no Brasil. Coordenação [Internet]. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>

IPPOLITO, L et al. Lactate: A Metabolic Driver in the Tumour Landscape. *Trends in biochemical sciences*, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 153–166, 2019.

JENKINS, R. W; BARBIE, D. A; FLAHERTY, K. T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer*. 118(1):9–16, 2018.

JIANG, X et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol. Cancer*. 18(1):10, 2019.

JIANG, Y; ZHAN, H. Communication between EMT and PD-L1 Signaling: New Insights into Tumor Immune Evasion. *Cancer Lett*. 468:72–81, 2020.

JIN, H. S et al. Extracellular pH modulating injectable gel for enhancing immune checkpoint inhibitor therapy. *J. Control. Release* 315, 65–75, 2019.

KALLURI, R; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, [s. l.], v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KARACOSTA, L. G et al. Mapping lung cancer epithelial-mesenchymal transition states and trajectories with single-cell resolution. *Nature communications*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 5587, 2019.

KIM, S. H; BAEK, K. H. Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect. *Int J Mol Sci*. Jun 8;22(12):6173, 2021.

KLATZMANN, D; ABBAS, A. K. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 15:283-294, 2015.

KNOPF, P et al. Acidosis-mediated increase in IFN γ induced PD-L1 expression on cancer cells as an immune escape mechanism in solid tumors. *Mol Cancer*. 22, 207, 2023.

KORETH, J et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 365(22):2055-66, 2011.

KOUIDHI, S. et al. Intrinsic and tumor microenvironment-induced metabolism adaptations of T cells and impact on their differentiation and function. *Front Immunol*. 7:114–114, 2016.

LANGIN, D. Adipose tissue lipolysis revisited (again!): lactate involvement in insulin antilipolytic action. *Cell metabolism*. 11(4):242-3, 2010.

- LARDNER, A. The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of leukocyte biology*, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 522–530, 2001.
- LEEMANS, C. R; SNIJDERS, P. J. F; BRAKENHOFF, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer*, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 269–282, 2018.
- LEFLER, D. S; MANOBIANCO, S. A; BASHIR, B. Immunotherapy resistance in solid tumors: mechanisms and potential solutions. *Cancer Biol Ther.* Dec 31;25(1):2315655, 2024.
- LEONE, R. D; POWELL, J. D. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer.* 20(9):516–531, 2020.
- LEQUERICA-FERNÁNDEZ, P et al. Prognostic Relevance of CD4+, CD8+ and FOXP3+ TILs in Oral Squamous Cell Carcinoma and Correlations with PD-L1 and Cancer Stem Cell Markers. *Biomedicines.* 9(6):653, 2021.
- LI, S et al. Immunoantitumor Activity and Oxygenation Effect Based on Iron-Copper-Doped Folic Acid Carbon Dots. *ACS Appl Mater Interfaces.*16(13):16653-16668, 2024.
- LIAO, P et al. CD8+ T cells and fatty acids orchestrate tumor ferroptosis and immunity via ACSL4. *Cancer Cell.* 40(4):365–378.e6, 2022.
- LIBERTI, M. V; LOCASALE, J. W. The Warburg effect: How does it benefit cancer cells?. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(4), 267-279, 2016.
- LIN, Y. J et al. Roles of neutrophils in glioma and brain metastases. *Front Immunol*, 701383, 2021.
- LIU, N et al. Lactate inhibits ATP6V0d2 expression in tumor-associated macrophages to promote HIF-2 α -mediated tumor progression. *Journal of Clinical Investigation.* 129(2):631–646, 2019.
- LIU, L. L et al. Coexpression of CMTM6 and PD-L1 as a predictor of poor prognosis in macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 70:417–429, 2021.
- LOVISA, S; ZEISBERG, M; KALLURI, R. Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 681–695, 2016.
- LU, Q et al. The expression of V-ATPase is associated with drug resistance and pathology of non-small-cell lung cancer. *Diagnostic pathology*, [s. l.], v. 8, p. 145, 2013.
- MAHONEY, B. P et al. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochemical pharmacology*, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 1207–1218, 2003.
- MANDAL, R et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight.* 1(17), 2016.
- MANI, S. A et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, [s. l.], v. 133, n. 4, p. 704–715, 2008.

- MAZET, J. M et al. IFN γ signaling in cytotoxic T cells restricts anti-tumor responses by inhibiting the maintenance and diversity of intra-tumoral stem-like T cells. *Nat Commun* 14, 321, 2023.
- MEEHAN, K et al. Characterization of the immune profile of oral tongue squamous cell carcinomas with advancing disease. *Cancer Med.* 9(13):4791–4807, 2020.
- MIGUEL, M et al. T-cell-engaging therapy for solid tumors. *Clinical Cancer Research.* 27(6):1595–1603, 2021.
- MOELLERING, R. E et al. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clinical & experimental metastasis*, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 411–425, 2008.
- MOTZER, R. J et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 373(19):1803–1813, 2015.
- MYERS, J. A; MILLER, J. S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 18(2):85–100, 2021.
- NELSON, B. H. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunological reviews*, [s. l.], v. 222, p. 101–116, 2008.
- NIETO, M. A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science*, [s. l.], v. 342, n. 6159, p. 1234850, 2013.
- NOMAN, M. Z et al. The Immune Checkpoint Ligand PD-L1 Is Upregulated in EMT-Activated Human Breast Cancer Cells by a Mechanism Involving ZEB-1 and MiR-200. *OncoImmunology.* 6:e1263412, 2017.
- OSTRAND-ROSENBERG, S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current opinion in genetics & development*, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 11–18, 2008.
- PAGÈS, F et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 1093–1102, 2010.
- PARKER, B. S; RAUTELA, J; HERTZOG, P. J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 16(3):131-44, 2016.
- PELLEGRINI, P et al. Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: implications for cancer therapies. *Autophagy*, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 562–571, 2014.
- PENG, M et al. Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science*, [s. l.], v. 354, n. 6311, p. 481–484, 2016.
- PEPPICELLI, S; BIANCHINI, F; CALORINI, L. Extracellular acidity, a “reappreciated” trait of tumor environment driving malignancy: perspectives in diagnosis and therapy. *Cancer metastasis reviews*, [s. l.], v. 33, n. 2-3, p. 823–832, 2014.
- PEPPICELLI, S et al. Extracellular acidity strengthens mesenchymal stem cells to promote melanoma progression. *Cell cycle*, [s. l.], v. 14, n. 19, p. 3088–3100, 2015.

- PEPPICELLI, S et al. The acidic microenvironment as a possible niche of dormant tumor cells. *Cell Mol Life Sci.* 74(15):2761–2771, 2017.
- PILON-THOMAS, S et al. Neutralization of Tumor Acidity Improves Antitumor Responses to Immunotherapy. *Cancer research*, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 1381–1390, 2016.
- PRUNES, B et al. The role of tumor acidification in aggressiveness, cell dissemination and treatment resistance of oral squamous cell carcinoma. *Life Sci.* 288:120163, 2022.
- PUIG-KRÖGER, A et al. Peritoneal dialysis solutions inhibit the differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: effect of lactate and glucose-degradation products. *Journal of leukocyte biology*, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 482–492, 2003.
- QIAN, B; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.
- RAGHUNAND, N; GILLIES, R. J. pH and drug resistance in tumors. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 39–47, 2000.
- RAGHUNAND, N; MAHONEY, B. P; GILLIES, R. J. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochemical pharmacology*, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 1219–1229, 2003.
- RAHMAN, A et al. Immunotherapy Enhancement by Targeting Extracellular Tumor pH in Triple-Negative Breast Cancer Mouse Model. *Cancers (Basel)*. 15(20):4931, 2023.
- RAYCHAUDHURI, D et al. Lactate Induces Pro-tumor Reprogramming in Intratumoral Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front Immunol.* 7;10:1878, 2019.
- RENNER, K et al. Restricting Glycolysis Preserves T Cell Effector Functions and Augments Checkpoint Therapy. *Cell Rep.* 29, 135–150.e9, 2019.
- RIEMANN, A; REIME, S; THEWS, O. Tumor Acidosis and Hypoxia Differently Modulate the Inflammatory Program: Measurements In Vitro and In Vivo. *Neoplasia*. 19, 1033–1042, 2017.
- ROBEY, I. F et al. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer research*, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 2260–2268, 2009.
- ROFSTAD, E. K et al. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer research*, [s. l.], v. 66, n. 13, p. 6699–6707, 2006.
- ROMEO, E et al. The Vicious Cross-Talk between Tumor Cells with an EMT Phenotype and Cells of the Immune System. *Cells*. 8:460, 2019.
- ROSENBERG, S. A. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol.* 192(12):5451-8, 2014.
- RUBENICH, D. S et al. Tumor-neutrophil crosstalk promotes *in vitro* and *in vivo* glioblastoma progression. *Front Immunol*, 14:1183465, 2023.

RUTKOWSKA, M et al. Oral cancer: the first symptoms and reasons for delaying correct diagnosis and appropriate treatment. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: official organ Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland*, v. 29, n. 6, p. 735-743, 2020.

SAADOUN, D et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med*. 365(22):2067-77, 2011.

SADEGHI, M et al. Integrative Analysis of Breast Cancer Cells Reveals an Epithelial-Mesenchymal Transition Role in Adaptation to Acidic Microenvironment. *Frontiers in oncology*, [s. l.], v. 10, p. 304, 2020.

SADLACK, B et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*, 75: 253-261, 1993.

SATTLER, U. G. A et al. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 102–109, 2010.

SAUVANT, C et al. Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, [s.l.], v. 123, n. 11, p. 2532–2542, 2008.

SCHLIEKELMAN, M. J et al. Molecular portraits of epithelial, mesenchymal, and hybrid States in lung adenocarcinoma and their relevance to survival. *Cancer research*, [s. l.], v. 75, n. 9, p. 1789–1800, 2015.

SCHMID, P et al. IMpassion130 trial investigators. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med*. 379(22):2108–2121, 2018.

SERTORIO, M et al. Cancer Cell Metabolism: Implications for X-ray and Particle Radiation Therapy. *International journal of particle therapy*, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 40–48, 2018.

SEGAL, N. H et al. ScienceDirect Safety and efficacy of durvalumab in patients with head and neck squamous cell carcinoma: results from a phase I/ II expansion cohort. 109 : 154–61, 2019.

SHARMA, V; KAUR, J. Acidic environment could modulate the interferon- γ expression: Implication on modulation of cancer and immune cells' interactions. *Asian Biomed (Res Rev News)*. 17(2):72-83, 2023.

SHAUL, M. E; FRIDLENDER, Z. G. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 601–20, 2019.

SHI, X et al. TGF- β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies. *J Hematol Oncol*. 17;15(1):135, 2022.

SIKIC, B. I et al. First-in-Human, First-in-Class Phase I Trial of the Anti-CD47 Antibody Hu5F9-G4 in Patients With Advanced Cancers. *J. Clin. Oncol*. 37, 946–953, 2019.

SILVA, A. O et al. A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. *Tumor Biol*. 37, 13743–13749, 2016.

SIMON, S. M; SCHINDLER, M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 91, n. 9, p. 3497–3504, 1994.

SMALLBONE, K et al. The role of acidity in solid tumour growth and invasion. *Journal of theoretical biology*, [s. l.], v. 235, n. 4, p. 476–484, 2005.

SOWA, T et al. Association between epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness and their effect on the prognosis of lung adenocarcinoma. *Cancer medicine*, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 1853–1862, 2015.

SU, Z et al. A carbon dot-doped Cu-MOF-based smart nanoplatform for enhanced immune checkpoint blockade therapy and synergistic multimodal cancer therapy. *J. Mater. Chem. B*. (19), 4211–4226, 2023.

SUIJKERBUIJK, S. J. E; VAN RHEENEN, J. From good to bad: Intravital imaging of the hijack of physiological processes by cancer cells. *Developmental biology*, [s. l.], v. 428, n. 2, p. 328–337, 2017.

SUNG, H et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, Hoboken, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SUTOO, S et al. Adaptation to chronic acidic extracellular pH elicits a sustained increase in lung cancer cell invasion and metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 133–144, 2020.

SUZUKI, H et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*. 268: 1472-1476, 1995.

SUZUKI, A et al. Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. *Cancer cell international*, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 129, 2014.

TANG, H; QIAO, J; FU, Y. X. Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 370:85–90, 2016.

TÉGLÁSI, V et al. PD-L1 expression of lung cancer cells, unlike infiltrating immune cells, is stable and unaffected by therapy during brain metastasis. *Clin. Lung Cancer*. 20:363–369.e2, 2019.

TRABOLD, O et al. Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing. *Wound Repair Regen*. 11, 504–509, 2003.

UMANSKY, V et al. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression. *Vaccines*. 4 (50):e2597, 2016.

VANDER HEIDEN, M. G et al. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324(5930):1029-33, 2009.

VERMA, A. K; MESSERLI, S. M; MISKIMINS, W. K. Lactate induces PD-L1 in HRAS-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 11, 1493–1504, 2020.

VISIOLI, F et al. Glucose-regulated protein 78 (Grp78) confers chemoresistance to tumor endothelial cells under acidic stress. *PLoS one*, [s. l.], v. 9, n. 6, p. e101053, 2014.

VOETS, E et al. Functional characterization of the selective pan-allele anti-SIRP α antibody ADU-1805 that blocks the SIRP α –CD47 innate immune checkpoint. *J Immunother Cancer* 7, 340, 2019.

VOSKIBOINIK, I; WHISSTOCK, J. C; TRAPANI, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 15(6):388–400, 2015.

WALDMAN, A. D; FRITZ, J. M; LENARDO, M. J. A guide to cancer immunotherapy: From t cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*. 20(11):651–17, 2020.

WAN, M et al. Metabolic manipulation of the tumour immune microenvironment. *Immunology*. 165(3):290–300, 2022.

WANG, J. X et al. Lactic acid and an acidic tumor microenvironment suppress anticancer immunity. *Int J Mol Sci*. 21:8363, 2020.

WANG, K; VELLA, A. T. Regulatory T Cells and Cancer: A Two-Sided Story. *Immunological investigations*, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 797–812, 2016.

WANG, R et al. Augmenting immunotherapy via bioinspired MOF-Based ROS homeostasis disruptor with nanozyme-cascade reaction. *Adv. Mater*. 35, 2306748, 2023.

WARBURG, O; WIND, F; NEGELEIN, E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. 8(6):519-30, 1927.

WEINBERG, R. A. *The Biology of Cancer*. 1st Editioned. [S. l.]: W.W. Norton & Company, 2013. E-book. Disponível em: <https://api.taylorfrancis.com/content/books/mono/download?identifierName=doi&identifierValue=10.1201/9780203852569&type=googlepdf>. Acesso em: 25 nov. 2023.

WILLERFORD, D. M et al. Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*. 3: 521-530, 1995.

WOJTKOWIAK, Jonathan W. et al. Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments. *Cancer research*, [s. l.], v. 72, n. 16, p. 3938–3947, 2012.

WU, S et al. The prognostic landscape of tumor-infiltrating immune cells and immune checkpoints in glioblastoma. *Technol Cancer Res Treat*, 18:1–10, 2019.

XIA, H et al. Suppression of FIP200 and autophagy by tumor-derived lactate promotes naïve T cell apoptosis and affects tumor immunity. *Science immunology*, [s. l.], v. 2, n. 17, 2017.

XIE, D; ZHU, S; BAI, L. Lactic acid in tumor microenvironments causes dysfunction of NKT cells by interfering with mTOR signaling. *Science China. Life sciences*, [s. l.], v. 59, n. 12, p. 1290–1296, 2016.

XIE, X; O'NEILL, W; PAN, Q. Immunotherapy for head and neck cancer: the future of treatment? *Expert Opin Biol Ther*. Jun;17(6):701-708, 2017.

XU, L; FUKUMURA, D; JAIN, R. K. Acidic Extracellular pH Induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Human Glioblastoma Cells via ERK1/2 MAPK Signaling Pathway: MECHANISM OF LOW pH-INDUCED VEGF. *The Journal of biological chemistry*, [s. l.], v. 277, n. 13, p. 11368–11374, 2002.

XU, Y et al. The roles of PD-1/PD-L1 in the prognosis and immunotherapy of prostate cancer. *Mol. Ther.* 29(6):1958–1969, 2021.

YAN, F et al. Hypoxia promotes non-small cell lung cancer cell stemness, migration, and invasion via promoting glycolysis by lactylation of SOX9. *Cancer Biol Ther.* 25(1):2304161, 2024.

YANG, Z. et al. Phosphofructokinase deficiency impairs ATP generation, autophagy, and redox balance in rheumatoid arthritis T cells. *J. Exp. Med.* 210, 2119–2134, 2013.

YANG, L; HU, X; MO, Y. Acidosis promotes tumorigenesis by activating AKT/NF- κ B signaling. *Cancer metastasis reviews*, [s. l.], v. 38, n. 1-2, p. 179–188, 2019.

ZHANG, D et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*, [s. l.], v. 574, n. 7779, p. 575–580, 2019.

ZHANG, L; LI, S. Lactic acid promotes macrophage polarization through MCT-HIF1 α signaling in gastric cancer. *Experimental cell research*, [s. l.], v. 388, n. 2, p. 111846, 2020.

ZHANG, X, et al. Nano-medicine therapy reprogramming metabolic network of tumour microenvironment: new opportunity for cancer therapies. *J Drug Target.* 32(3):241-257, 2024.