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: Profª Drª 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 Josoé, 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 calmaria 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 mestranda, 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 (IFNγ) utilizando o kit Enzyme Linked Immunonosorbent 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 IFNγ em meio ácido ($p>0.05$). Não foi detectado IFNγ 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 (IFNγ) 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 IFNγ in acidic medium ($p>0.05$). IFNγ 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

IFNγ – 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 Citotóxicos

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 CARCINOGÊNESE 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……...……..55

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……..……56

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

1.1 CARCINOGÊNESE 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.

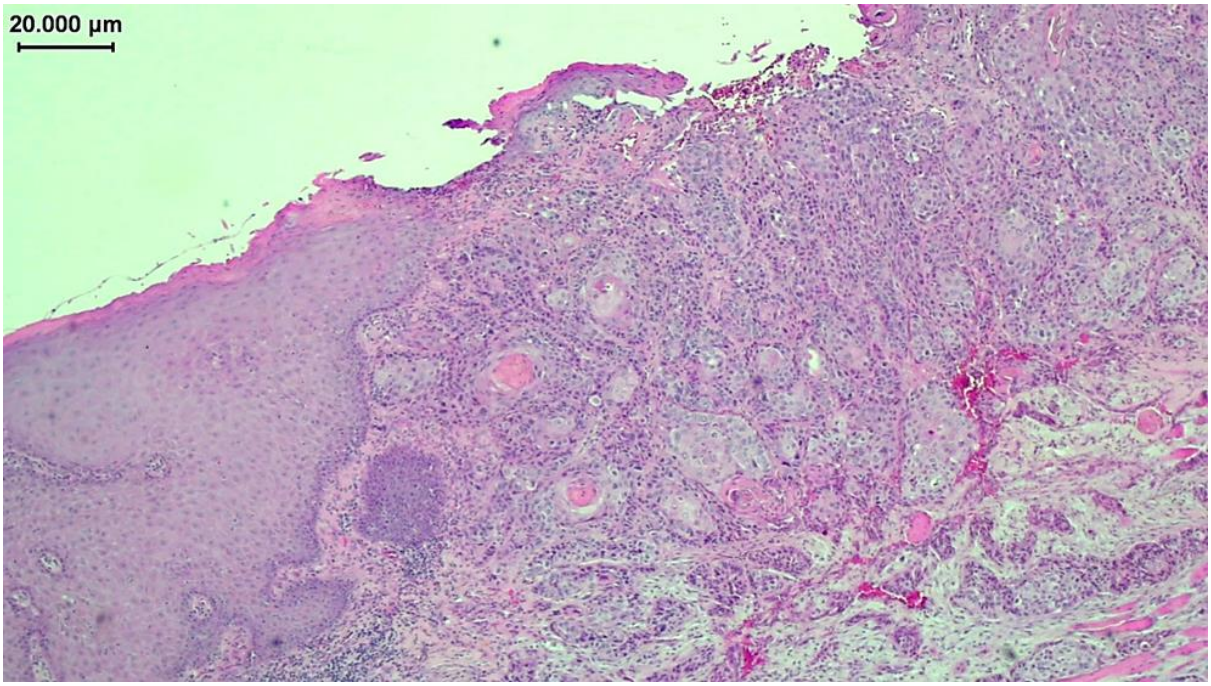


Figura 2 – Corte histológico de lesão de carcinoma espinocelular bucal apresentando ilhas de epitélio escamoso neoplásico invadindo o tecido conjuntivo. No interior das ilhas observa-se a formação de pérolas de ceratina (coloração HE, ampliação 200 ×, escala = 20um). Fonte: FO-UFRGS, 2023.

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).

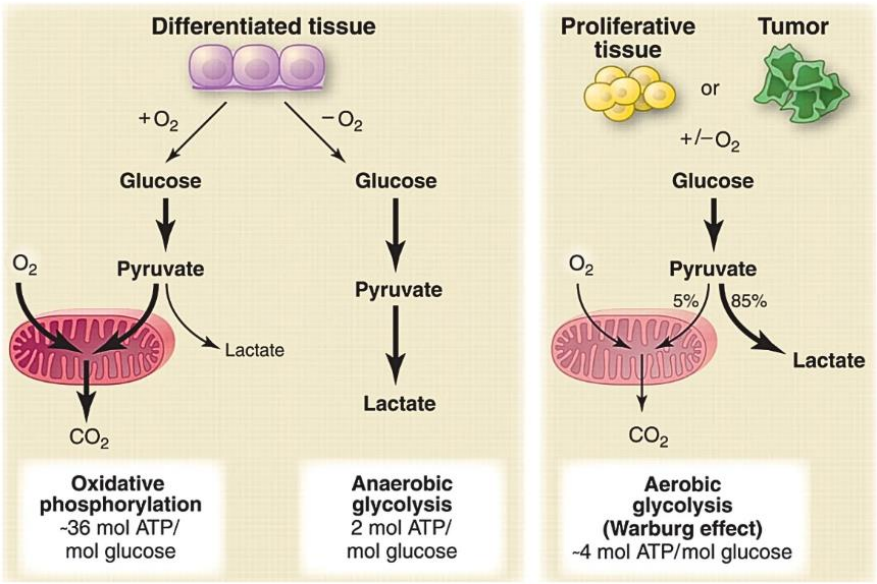


Figura 3: As diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (efeito Warburg) são demonstradas nesta imagem. Células diferenciadas metabolizam glicose em piruvato via glicólise, oxidando-o completamente na mitocôndria em presença de oxigênio, produzindo CO2. Em condições 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).

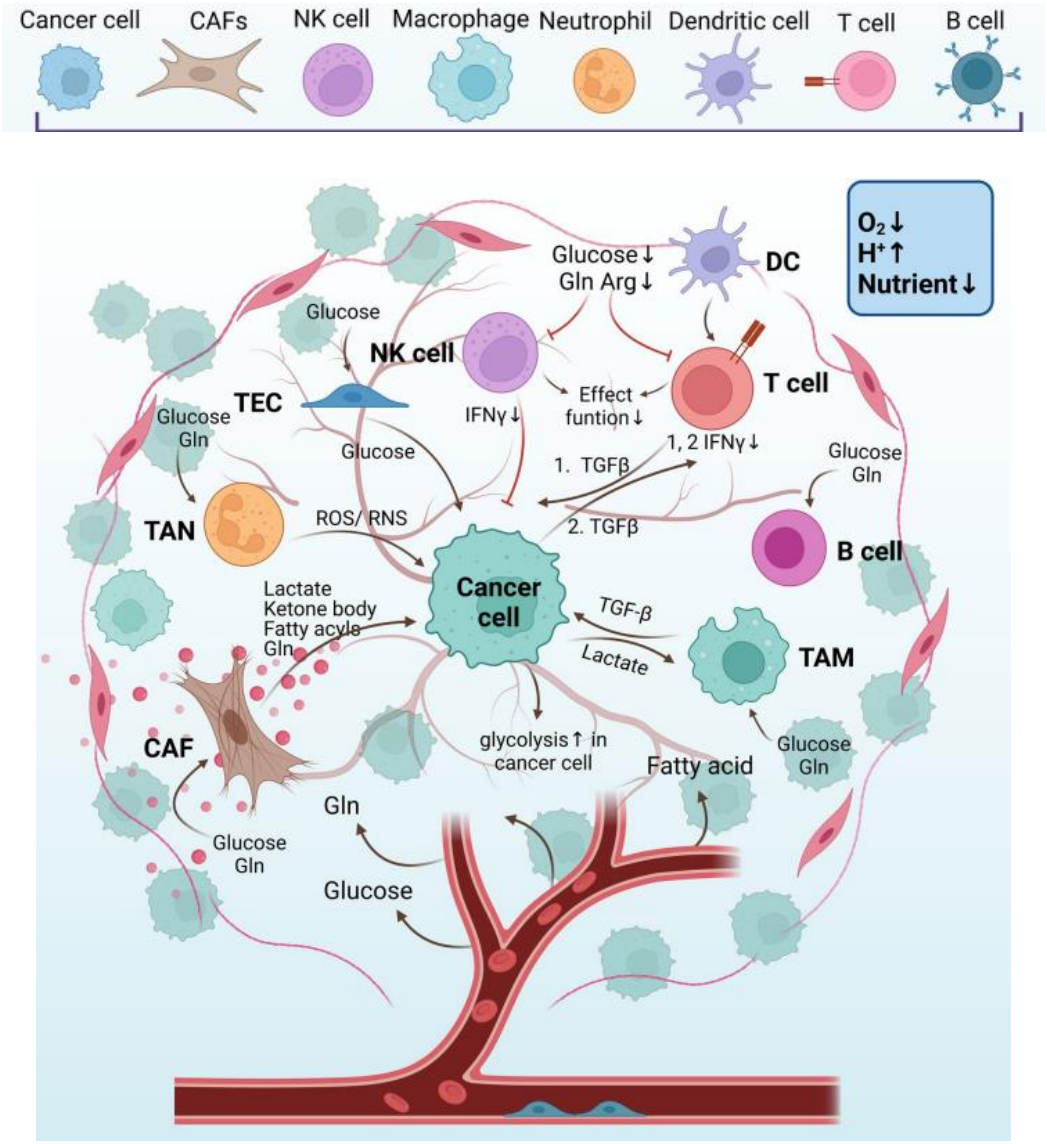


Figura 4 - Desenho esquemático de um tumor sólido demonstrando os componentes microambiente tumoral. Ressalta-se o baixo aporte de oxigênio, nutrientes e glicose seguidos de elevadas concentrações de íons H+ e lactato. Fonte: SHI et al., 2022.

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).

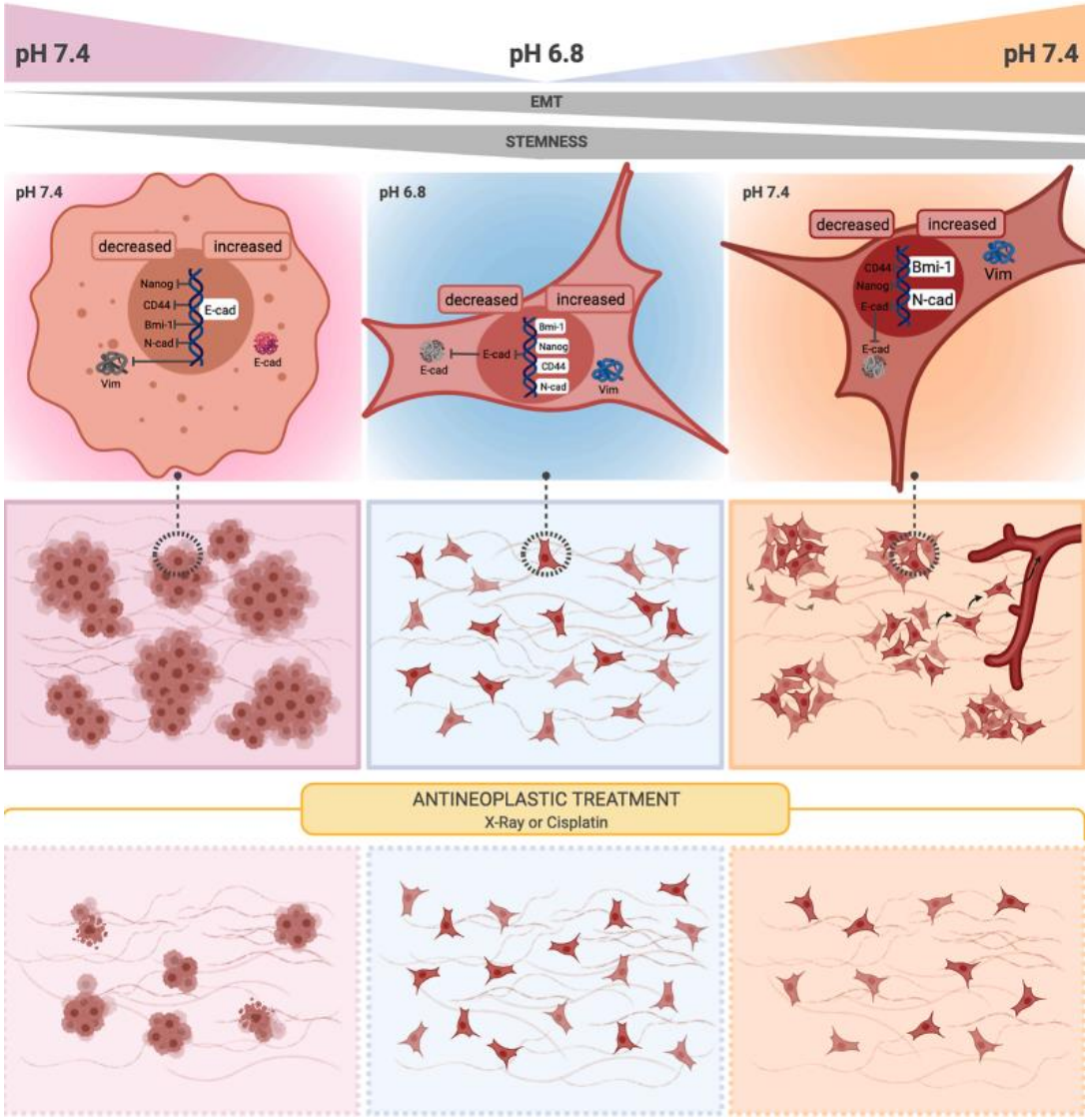


Figura 5 - Padrão molecular e fenotípico de células do CEC bucal de acordo com o pH extracelular antes e após o tratamento antineoplásico. O microambiente ácido causa um processo de adaptação celular, uma vez que reduz a viabilidade das células cancerígenas, seguida de alterações fenotípicas, comportamentais 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, consequentemente, 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 (IFNγ), 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 IFNγ, 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 IFNγ 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 IFNγ 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 onco-imunoterápicos 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 IFNγ;
- 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*

Abstract

A notable characteristic of the tumor microenvironment (TME) is the acidification of the extracellular pH. This study investigated the effects of acidic TME on the immune response of T cells (Jurkat) against oral cancer tumor cells (SCC25). Individual and co-culture experiments were conducted using 2D or 3D models of these cell lines in neutral (pH 7.4) and acidic (pH 6.8) conditions. Outcomes were evaluated through Cumulative Population Doubling (CPD), Optical Density (OD), Immunofluorescence, Western Blot, ELISA, and Flow Cytometry. Acidic medium decreased T cell proliferation and viability ($p<0.001$), increased SCC25 proliferation ($p<0.01$), and enhanced expression of Vimentin, a marker associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT). Acidification also increased resistance of malignant cells to T cell-induced death ($p<0.001$). No differences were observed in PD-L1 expression on SCC25 cells or PD-1 expression on T cells at pH 6.8. Spheroids formed by SCC25 in acidic medium initially showed smaller size and aggregation, followed by stability ($p<0.001$). OD of spheroids in acidic medium was initially higher ($p<0.001$) and decreased over time compared to pH 7.4 spheroids. In co-culture, there was higher secretion of interferon-gamma (IFNγ) in acidic medium ($p>0.05$), and interleukin-2 (IL-2) secretion by tumor cells increased at pH 6.8. These findings underscore that TME acidity facilitates evasion of immune response by cancer cells and promotes tumor progression.

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

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) bucal está entre os tipos mais comuns de neoplasias malignas que atingem a população mundial. No ano de 2022 a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) estimou a ocorrência de 389.846 novos casos e 188.438 óbitos por câncer de boca no mundo. A localização mais comum do câncer de boca é em língua, na maior parte das vezes os casos são diagnosticados em estágios avançados da doença, sendo necessário então uma abordagem terapêutica multimodal que consiste em cirurgia, radioterapia, quimioterapia e, mais recentemente, imunoterapia combinados. No entanto, ainda apresenta alta mortalidade, com sobrevida de aproximadamente 50% em 5 anos (BRAY et al., 2024;

LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018; RUTKOWSKA et al., 2020; SEGAL et al., 2019).

Uma das razões para o fracasso do tratamento do CEC é a 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 e fenotípicas. 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). Mesmo em tumores estabelecidos ocorre uma competição por nutrientes, como glicose, ácidos graxos e aminoácidos resultando no MT, que quando associado à hipóxia induzida pela falta de vasos sanguíneos normais e à glicólise aumentada se torna ácido, com valores de pH oscilando entre 6,2 e 6,9, substancialmente inferiores aos níveis fisiológicos dos tecidos (~pH 7.4), sendo que essa acidez está relacionada à supressão do sistema imunológico, reduzindo a liberação de interferon-gama (IFNγ) e promovendo o crescimento do tumor (BRAND et al., 2016; KOUIDHI et al., 2016; MYERS; MILLER, 2021; SHI et al., 2022).

Durante o processo de crescimento tumoral o sistema imunológico desempenha um papel crucial como uma linha de defesa importante e, nesse contexto, as imunoterapias têm surgido como uma nova e promissora opção para o controle tumoral (RAHMAN et al., 2023; WEINBERG, 2013). As células imunes adaptativas consistem em células T, das quais podemos citar as células T CD4+ e T CD8+. Essas células são, em última instância, responsáveis pela etapa final do processo de regulação imunológica dos cânceres: reconhecer e eliminar as células tumorais (MYERS; MILLER et al., 2021; OSTRAND-ROSENBERG, 2008; VOSKIBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015). As células T CD4+ do tipo 1 (Th1), quando ativadas pela interleucina 12 (IL-12), 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, incluindo IFNγ, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), IL-2 e IL-12. 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 (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; OSTRAND-ROSENBERG, 2008; LEQUERICA-FERNÁNDEZ et al., 2021; ZHANG et al., 2024).

As vantagens adaptativas resultantes das condições adversas do MT incluem a acidificação do compartimento extracelular, a presença de lactato e estão intimamente relacionadas ao impacto da resposta imunológica frente aos tumores. A acidez tumoral enfraquece a imunovigilância, pois está associada à capacidade de supressão da atividade antitumoral das células T, contribuindo para a consolidação de mecanismos de escape imunológico (ESTRELLA et al., 2013; GATENBY; GILLIES, 2004; HJELMELAND et al., 2011; LEFLER; MANOBIANCO; BASHIR, 2024; MOELLERING et al., 2008; SMALLBONE et al., 2005; ZHANG; LI, 2020). Recentemente, 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 oral ao longo da última década. No entanto, apesar de tantos avanços na área ainda existe uma parcela de pacientes que não se beneficiam deste tratamento (ARMAND et al., 2021; BELLMUNT et al., 2017; CHENG et al., 2024; DAASSI; MAHONEY; FREEMAN, 2020; MOTZER et al., 2015; SCHMID et al., 2018). Dessa forma, levando em consideração a necessidade de elucidação de como os fatores biológicos inerentes ao microambiente de cada tumor influenciam na eficácia da imunoterapia e o quanto isso é decisivo para alterar as taxas de sucesso desse tipo de tratamento, este trabalho teve como objetivo analisar a influência da acidez no MT do CEC bucal sobre a resposta imune antitumoral.

METODOLOGIA

Cultivo Celular

Foram utilizadas duas linhagens de células, sendo a de células tumorais de carcinoma espinocelular bucal SCC25 (ATCC® CRL-1628 ™) e a linhagem de células T CD4+ Jurkat (ATCC® TIB152™). Os grupos foram divididos em controle (meio de cultivo com pH neutro 7.4) e ácido (meio de cultivo acidificado com HCl pH 6.8) (PRUNES et al., 2022). Para as células SCC25, foi utilizado meio de cultivo celular Eagle modificado por Dulbecco (DMEM,

12100046, Thermo Scientific) e para as células T CD4+ Jurkat foi utilizado meio de cultivo celular RPMI. Posteriormente, as células SCC25 também foram cultivadas com meio RPMI, visto que este foi o meio de escolha para o co-cultivo e que também permitiu a acidificação. Para controle, o meio de cultivo foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Thermo Scientific, 12657FBS), 5mM de Hepes (Thermo Scientific, 15630080), 3,7g de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, S5761, St. Louis, Missouri, EUA), 100U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (Thermo Scientific, 15240062). As células dos grupos de exposição ácida foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Thermo Scientific, 12657), 5mM de Hepes (Thermo Scientific, 15630080) e 25mM de Pipes (Sigma-Aldrich), 100U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina (Thermo Scientific, 15240062) e acidificados com ácido clorídrico a 5M (Merck, Darmstadt, Alemanha, HC886668) de acordo com protocolo estabelecido por Prunes e colaboradores (2022). O controle do pH foi mensurado com pHmetro (Analion, Ribeirão Preto, SP, Brazil, PM608). As células foram mantidas em ambiente úmido a 37°C e a 5% de CO2 e tiveram seu crescimento celular monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Biostar, American Optical). Os grupos testes foram mantidos no meio de cultura acidificado com HCl por períodos que variaram de 12 horas a 14 dias. O grupo controle foi mantido em meio neutro constantemente (pH 7.4).

Para testes com ativação, as células SCC25 receberam estímulo com IFN-y, que está envolvida na regulação da resposta imune com efeito antitumoral, em meio de cultura DMEM (12100046, Thermo Scientific) a 100ng/mL (Sigma-Aldrich) durante as 24 horas que antecederam os experimentos. As células Jurkat foram ativadas com Forbol 12-myristate-13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich), ativador da proteína quinase C (PKC), estimulante de interleucina 2 (IL-2) a 100ng/mL durante as 24 horas que antecederam os experimentos.

As células aderentes da linhagem de carcinoma espinocelular SCC25 foram co-cultivadas com os linfócitos T não aderentes da linhagem de células T Jurkat após exposição às diferentes condições experimentais (controle e ácido – HCl) e estímulo prévio com IFNy (SCC25) e PMA (Jurkat) em diferentes proporções de células Jurkat por SCC25.

Análise de Viabilidade Celular

O ensaio de duplicação cumulativa da população foi realizado para análise da viabilidade celular conforme protocolo previamente estabelecido na literatura (SILVA et al.,

2016). Células T e SCC25 foram plaqueadas a uma densidade de 5.000, 10.000 ou 20.000 células por poço em placa de 6 poços, produzindo uma densidade de 50 células/mm2 (~5% confluência), 100 células/mm2 (~10% confluência) ou 200 células/mm2 (~20% confluência), dependendo da condição experimental, e analisadas em 7, 14 e 21 dias. As células foram contadas através câmara de Neubauer após visualização em câmera (Axiocam mrn, Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Alemanha) usando o AXIOVISION Software (Zeiss, Göttingen, Alemanha). A viabilidades das células T também foi avaliada utilizando o marcador de morte celular iodeto de propídeo (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA) e a leitura da quantidade de células foi realizada com o equipamento CellDrop (DeNovix, Wilmington, USA).

Western Blot

O lisado de proteína de células foi extraído utilizando tampão RIPA e cocktails inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich). Um total de 20 μg de proteína desnaturada foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) e transferidos para membranas de difluoreto de polivinila (PVDF) (Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA). Após o bloqueio com leite 5% (Nestlé, Brasil), as membranas foram incubadas com anticorpos primários e secundários acoplados à peroxidase de rábano para os marcadores de TEM E-caderina, Vimentina e Actina como controle endógeno (Antibody kit 9782T, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, NÓS). As membranas foram incubadas em solução de quimioluminescência (Thermo Scientific) e reveladas.

Imunofluorescência

Para avaliar a expressão e localização do marcador Vimentina a nível de células individuais, as células SCC25 foram semeadas em placas de 12 poços (Greiner Bio-One), mantidas por 48 horas sob condições normais de crescimento e depois tratadas de acordo com seus grupos experimentais (meios com pH 7.4 e pH 6.8). As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 min a 4 ° C, incubadas durante 30 min em Triton-X100 5% e bloqueadas durante 30 min com tampão (Tween 20 a 0, 2% e BSA a 1% em PBS). As células foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o primeiro anticorpo, seguida de

incubação durante 30-60 minutos com o anticorpo secundário. Os núcleos foram visualizados com DAPI (Sigma, diluição 1:1000). As lamínulas foram montadas com VectaMount (Vector Laboratories) e analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus BX-50F). As fotos foram tiradas de pelo menos cinco áreas individuais usando a câmera Olympus XC30.

Citometria de Fluxo

Foi realizada análise com anexina V - FITC/PI (Sigma-Aldrich) para avaliar os níveis de apoptose e necrose das células Jurkat e SCC25 após exposição às diferentes condições experimentais (controle e ácido – HCl) e co-cultivo no Citômetro de Fluxo Attune (Thermo scientific). Além disso, as células do controle coradas com anexina V ou PI foram utilizadas para garantir que a citometria de fluxo corretamente as identificasse como células saudáveis/viáveis, apoptóticas, apoptóticas tardias ou necróticas. Células necróticas de controle foram produzidas pela adição de peróxido de hidrogênio a 4mM por 4 horas. Células apoptóticas de controle foram produzidas pela adição de peróxido de hidrogênio a 2mM por 4 horas.

A expressão de PD-1 (Cat. No. 3299350, BioLegend) e PD-L1 (Cat. No. 329707, BioLegend) na membrana celular das células T e SCC25 foi avaliada no Citômetro de Fluxo Melody (BD) após incubação com os respectivos anticorpos por um período de 3 horas. Todas as leituras foram realizadas no citômetro de fluxo Attune (Thermo Fischer). Os dados foram processados utilizando o software FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, Ore).

Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA)

O ensaio de ELISA de fluxo foi analisado através do equipamento SpectraMax (Molecular Devices). As células T e SCC25 foram cultivadas em meio DMEM e RPMI sem soro fetal bovino de acordo com os grupos experimentais (controle, ácido - HCl e lactato). O sobrenadante das células tumorais cultivadas nos diferentes grupos experimentais foi coletado e submetido aos testes ELISA MAX™ Standard Set Human IL-2 (Cat. No. 431801, BioLegend) e ELISA MAX™ Standard Set Human IFNy (Cat. No. 430101, BioLegend) para quantificação das citocinas inflamatórias.

Cultivo 3D

Células SCC25 foram plaqueadas em recipientes não aderentes de 96 poços revestidos com agarose 1,5% (50.000 células/poço em 100uL de meio de cultura nas condições de meio DMEM f12, meio RPMI pH 7.4 e meio RPMI pH 6.8) para formação dos esferóides. As placas foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO2 durante três dias. Foram realizadas fotos dos esferóides em diferentes momentos (12, 24, 48 e 72 horas) com câmera (Axiocam mrn, Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Alemanha) usando AXIOVISION Software (Zeiss, Göttingen, Alemanha).

Para a realização do co-cultivo, após 12 horas da semeadura das células SCC25 em cultivo 3D (quando o esferóide já estava formado) foram adicionadas células T (50.000 células/poço em 100uL dos respectivos meios Dmem F12 ou RPMI) sobre os esferóides de cada grupo destinado ao co-cultivo. As placas foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO2 durante três dias. Foram realizadas fotografias dos esferóides em diferentes momentos (12, 24, 48 e 72 horas).

Microscopia *Time Lapse*

Os esferóides formados previamente foram transferidos para uma nova placa com meio de cultivo neutro ou ácido, contendo ou não células T. Posteriormente foram fotografados com um microscópio (Zeiss Axio Observer Z1) com câmera axiocam acoplada e equipado com um estágio motorizado controlado por temperatura. As células foram visualizadas em 10 × em campo claro em múltiplas posições a cada 5 minutos por 72 horas.

Análise Morfométrica de Agregados Celulares

Imagens dos esferóides foram adquiridas em 12, 24, 48 e 72 horas e analisadas usando o Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda). Parâmetros foram escolhidos para avaliar a cinética de formação dos esferóides: área, perímetro e escala de cinza. De acordo com a definição do software, o parâmetro área compreendeu todos os pixels dentro do perímetro de

cada “objeto” selecionado, fornecendo uma medida de tamanho para os esferóides gerados. O valor da área em pixels foi convertido para o valor da área em micrômetros quadrados (μm2) usando o tamanho de uma barra de escala de micrografias na objetiva 4x (1 pixel = 0,0092 pixels/um).

A agregação celular foi avaliada através da análise de escala de cinza dos esferóides ao longo do tempo. Foi utilizado o software ImageJ utilizando o plugin de calibração de densidade óptica (OD), sendo que o valor OD e a luminosidade presentes no esferóide são diretamente proporcionais (https://imagej.net/ij/docs/examples/calibration/).

Avaliação Histopatológica de Culturas 3D

Os esferóides foram fixados com paraformaldeído a 4% durante 18 horas e posteriormente incluídos em molde de agarose 2% contendo micropoços para cada esfera (UMANSKY et al., 2016). O molde foi inserido no cassete histológico para processamento no equipamento histotécnico OMA pv.85 (Instrumental OMA Ltda, São Paulo, Brasil). O material foi desidratado com uma série de soluções alcoólicas com concentrações crescentes (banho de metanol 50%, 70%, 90% e quatro banhos em metanol 100%, 1 hora cada), seguido do processo de clarificação de 3 banhos de xileno (1 hora cada) e impregnação com parafina líquida (2 banhos de 2 hora cada). Seções de lâminas de 3 μm foram realizadas em um micrótomo Leica RM2255 (Leica Microsystems, Inc., Wetzlar, Alemanha). O material obtido foi coletado em lâminas de microscopia com carga positiva. Para hematoxilina e eosina (HE), as lâminas de coloração foram desparafinadas com 3 banhos de xilol (5 minutos cada) e reidratadas em banhos de etanol em escala descendente (1 minuto cada). A coloração foi realizada com hematoxilina monohidratada (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e eosina amarelada (Synth, Diadema, Brasil).

Análise Estatística

A análise da distribuição dos dados foi realizada. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (DP) ou como erro padrão da média (SEM). Para comparação estatística dos grupos foram utilizados os testes ANOVA ou ANOVA two-way, seguidos do teste de

Bonferroni, post-hoc de Tukey ou teste t de Student, conforme forem apropriados, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA). O nível de significância considerado foi $p<0.05$.

RESULTADOS

A acidez extracelular altera a capacidade proliferativa de linfócitos T e células tumorais

Com o propósito de simular a influência de um microambiente tumoral ácido *in vitro*, procedemos à cultura de células CEC SCC25 e células T em meio de cultura neutro (RPMI pH 7.4) e acidificado (RPMI pH 6.8), uma vez que estudos anteriores evidenciam que o pH do CEC varia entre 6,2 e 6,9 (BECELLI et al., 2007; PEPPICELLI et al., 2017). Posteriormente, foi realizada análise do impacto destas condições na adaptação e sobrevivência celular.

Achados do ensaio de Duplicação Cumulativa da População (CPD) relativo ao crescimento celular em diferentes condições revelaram bom crescimento das células tumorais SCC25 em 7 dias de cultivo em RPMI que passou a ser prejudicado após esse período, especialmente quando mantidas em pH 7.4 ($p<0.01$), enquanto que as células em meio ácido apresentaram melhor adaptação (Fig. 1A). Já as células T demonstraram diminuição significativa da atividade proliferativa dos linfócitos T no pH 6.8 ($p<0.001$) (Fig. 1B). Nesse contexto, o pH ácido diminuiu a capacidade proliferativa das células T.

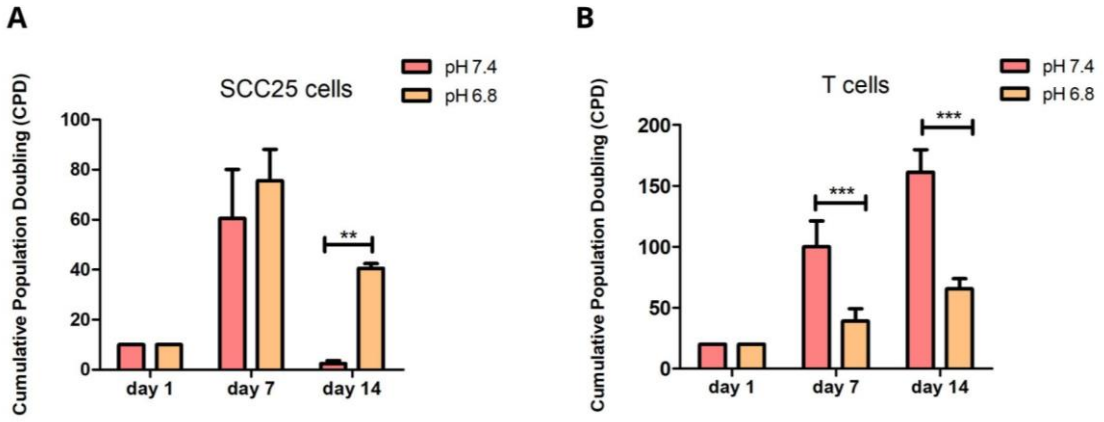


Figura 1. A análise de multiplicação celular das linhagens SCC25. B, análise das células T por meio do método de duplicação cumulativa da população (CPD). (**) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.01$). (***) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.001$).

A acidificação do pH extracelular diminui a viabilidade das células T ao longo do tempo

Foi realizado o ensaio de viabilidade das células T utilizando iodeto de propídio como marcador de células mortas. Observou-se que para as células mantidas em pH 7.4 não há alteração na proporção de células viáveis e células mortas, enquanto que para as células mantidas em pH 6.8 observamos uma diminuição do número de células viáveis (Fig. 2A) e um aumento de células mortas (Fig. 2B). Dessa forma, podemos observar que a acidez do MT leva à diminuição da viabilidade das células T ao longo do tempo.

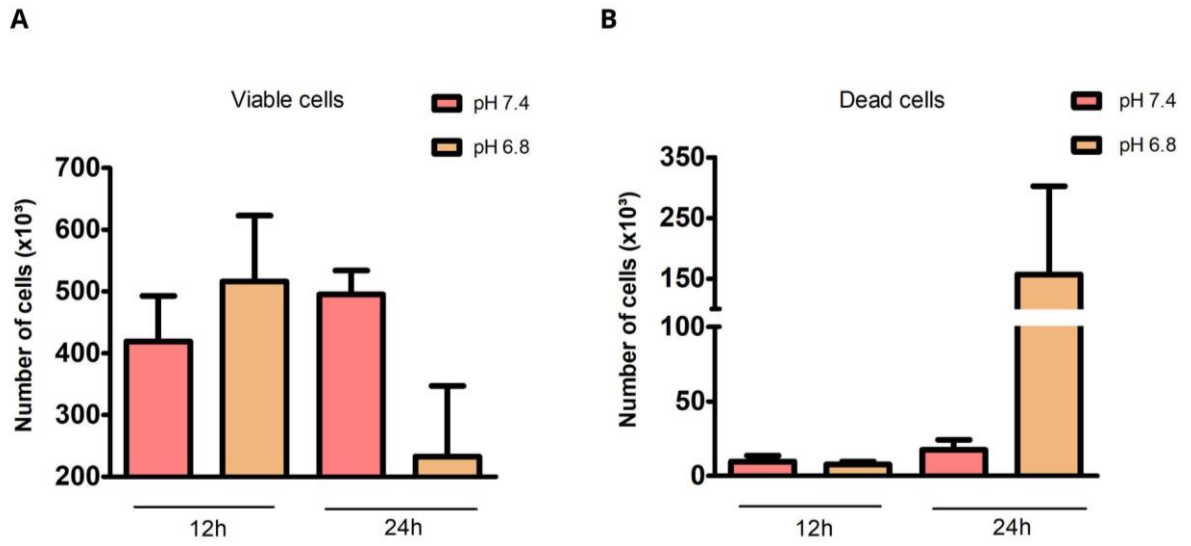


Figura 2. Análise da viabilidade das células T expostas isoladamente aos meios de cultura ácido e básico utilizando marcação com iodeto de propídio. A, quantificação das células viáveis. B, quantificação das células mortas, positivas para iodeto de propídeo.

O pH ácido promove mudanças fenotípicas nas células tumorais SCC25 e aumenta a expressão de marcadores de Transição Epitélio-Mesênquima (TEM)

A acidez do MT promove alterações fenotípicas e morfológicas nas células tumorais SCC25 (Fig. 3A), associadas a modificações na expressão de marcadores TEM. A expressão e a localização dos marcador mesenquimal Vimentina a nível celular foi mensurado por imunofluorescência, pela qual se observou aumento da expressão do marcador após exposição ao pH 6.8 em comparação à condição padrão de pH 7.4 ao longo do tempo (Fig. 3B). Quando

as células são expostas à acidose, a expressão de Vimentina, um marcador mesenquimal, aumenta nas primeiras 48 horas e tem pequena diminuição ao final de 72 horas de exposição. No entanto, a proteína E-caderina aumenta nas primeiras 24h e depois decai em 72h (Fig. 3C).

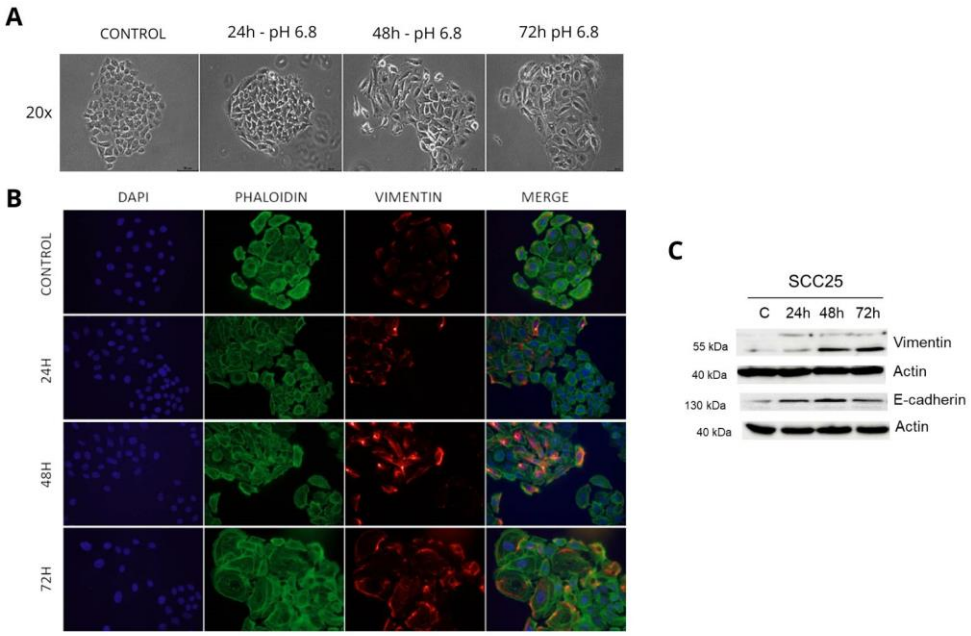


Figura 3. Avaliação de alterações fenotípicas e expressão de marcadores de TEM. A, aspectos morfológicos das células SCC25 ao longo da exposição à acidez. B, múltipla marcação de imunofluorescência para evidenciação do marcador vimentina nas células SCC25. C, Western Blot e quantificação normalizadas dos níveis de vimentina e E-caderina na linhagem de células tumorais SCC25 cultivadas em meio neutro (controle - pH 7.4) e ácido (pH 6.8) durante tempos experimentais distintos.

A acidez extracelular aumenta o número de células T apoptóticas e necróticas quando comparadas com as células tumorais

O ensaio de citometria de fluxo utilizando Anexina como marcador de apoptose e Iodeto de Propídio como marcador de necrose celular foi realizado (Fig. 4). Com este resultado, foi possível observar aumento do número de células tumorais SCC25 apoptóticas tardias (dupla marcação) no meio ácido após 24 horas ($p=0.0301$) (Fig. 4A). Em contrapartida, as células T demonstraram aumento significativo das células apoptóticas tardias e em necrose ($p<0.001$) quando expostas ao meio com pH 6.8 no período de 24 horas (Fig. 4B). Com base nisso, podemos perceber que o pH ácido atua de forma mais agressiva nas células T, que são mais suscetíveis aos danos causados por essa condição.

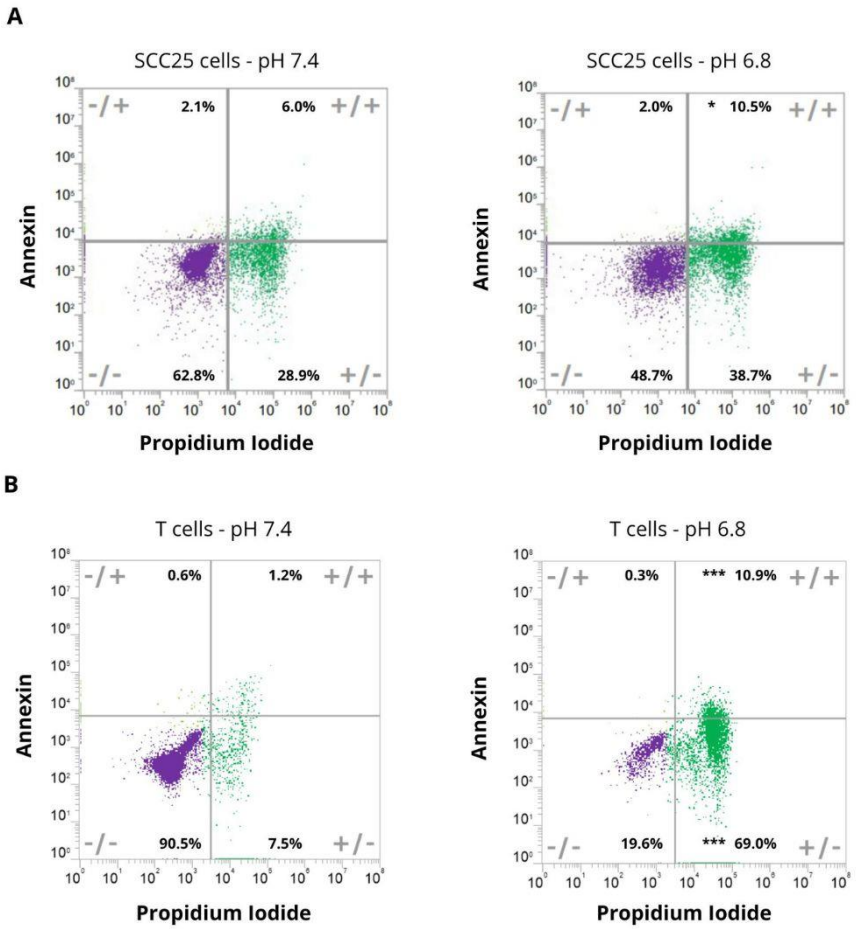


Figura 4. Imagens representativas da análise de apoptose e necrose através da Citometria de Fluxo utilizando os marcadores Anexina e Iodeto de Propídio (n = 3). A, análise da linhagem e celulares SCC25. B, análise de apoptose e necrose nas células T. (*) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.05$). (***) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.001$).

O pH altera a capacidade citotóxica das células T contra as células SCC25 em um sistema de co-cultivo

Foi realizado o co-cultivo das células T e SCC25 por 72h semeando a mesma quantidade de ambas as células, realizando ou não a ativação das células com PMA e/ou IFNy, respectivamente. Após o experimento observou-se que a ativação mútua das células aumenta a capacidade citotóxica das células T contra a linhagem tumoral SCC25 (Fig. 5A). Já nas demais condições de ativação, pode-se perceber que apesar das células tumorais SCC25 serem mais resistentes à morte no meio ácido e terem uma maior capacidade de proliferação, no meio com pH 7.4 as células T conseguem controlar o crescimento das células tumorais em todas as

condições de ativação (Figs. 5B, C, D). Nesse contexto, podemos concluir que a acidez tumoral contribui para maior resistência das células tumorais à morte induzida pelas células T.

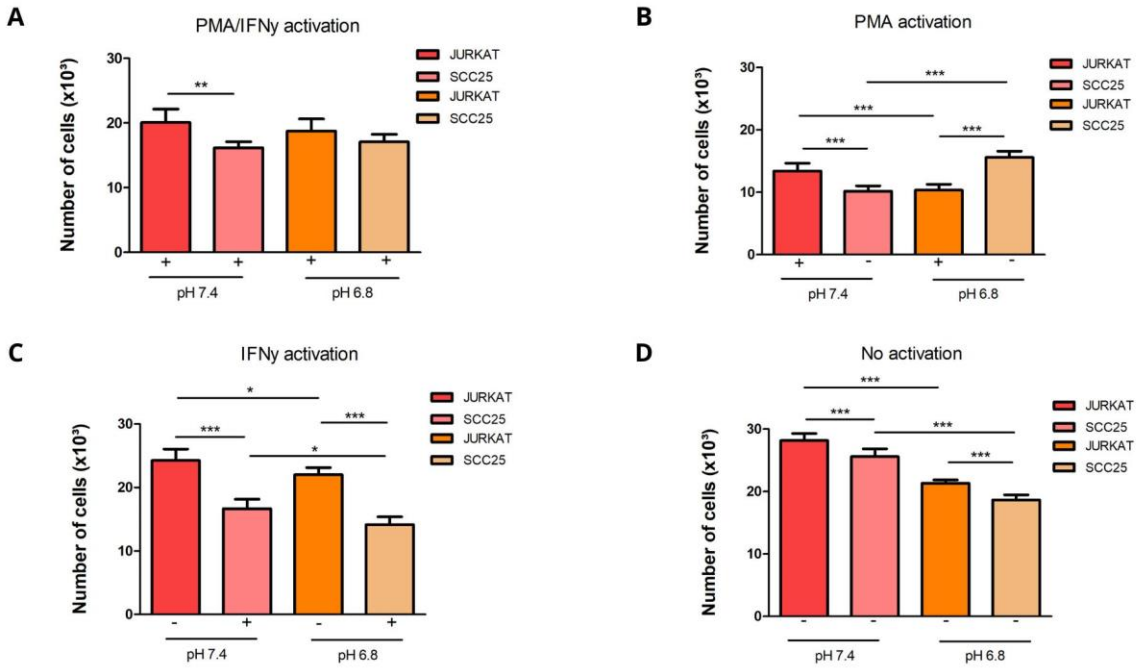


Figura 5. Co-cultivo das células T e SCC25 pelo período de 72 horas em diferentes condições de pH. A, co-cultivo com dupla ativação prévia. B, pré-ativação apenas das células T com PMA. C, pré-ativação apenas das células SCC25 com IFNy. D, análise sem pré-ativação de nenhum dos tipos celulares. (*) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.05$). (**) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.01$). (***) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.001$).

Expressão de marcadores de superfície celular PD-L1 e PD-1

A expressão dos checkpoint imunológicos PD-L1 e PD-1 em um tempo experimental de 12 horas foi investigada por citometria de fluxo nas células SCC25 e células T, respectivamente. Não detectamos diferença na proporção de células SCC25 positivas para PD-L1 quando expostas ao meio ácido (pH 6.8), sendo aproximadamente 90% das células positivas para esse marcador (Fig. 6A). Em contrapartida, vemos uma diminuição discreta e não significativa de PD-1 nas células T cultivadas em pH 6.8 (Fig. 6B).

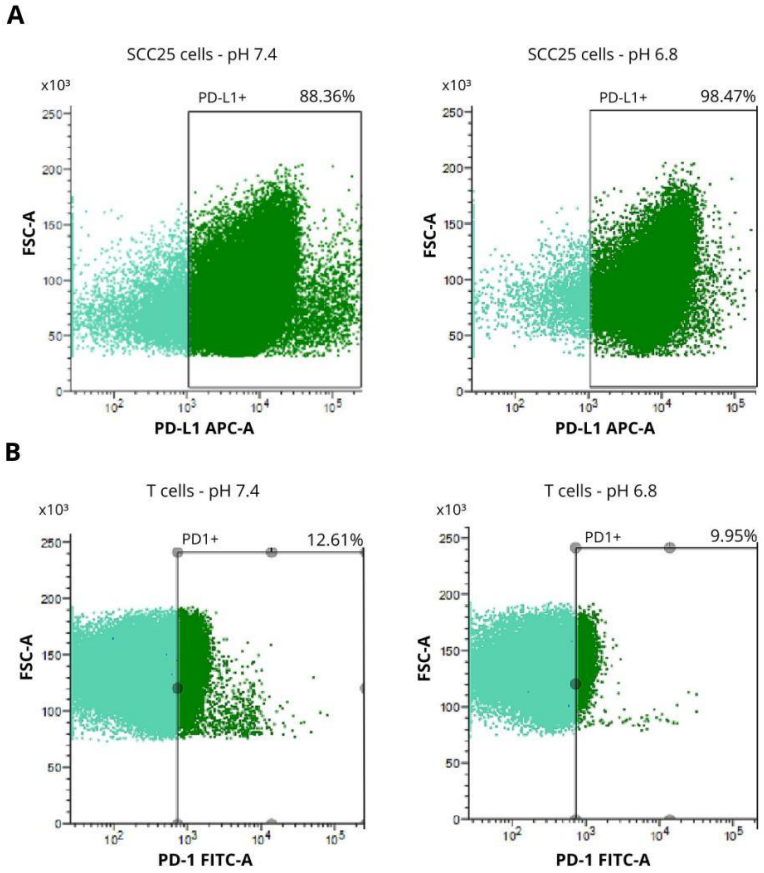


Figura 6. Análise dos check-points imunológicos após exposição ácida em um período de 12 horas (n = 3). A, avaliação da expressão de PD-L1 na linhagem de células tumorais SCC25. B, avaliação da expressão de PD-1 nas células T.

Modelo de cultura 3D das células tumorais SCC25 em pH 7.4 e pH 6.8

Avaliamos o crescimento de esferóides formados por células tumorais SCC25 de forma isolada períodos de 12, 24, 48 e 72 horas em diferentes condições de pH (pH 7.4 e pH 6.8). Esferas formadas pelas células tumorais SCC25 isoladamente em seu meio ótimo para crescimento DMEM F12 demonstraram diminuição da sua área e perímetro ($p<0.001$) nas primeiras 48 horas, seguida de posterior expansão (Fig. 7A). As esferas formadas pelas células SCC25 que foram cultivadas em meio RPMI com pH 7.4 também apresentaram menores dimensões de área e perímetro no pH 7.4, em contrapartida os esferóides mantidos em ambiente ácido apresentaram uma diminuição de área e perímetro nas primeiras 24h, seguidos por um período de estabilidade ($p<0.001$) (Fig. 7A). A agregação celular foi avaliada através da análise de *optical density* (OD) em uma escala de cinza, quanto mais escuro menor o valor de OD e mais agregadas estão as células. Observamos que os esferóides formados pela linhagem de

células tumorais SCC25 em meio DMEM F12 (pH 7.4) e RPMI neutro (pH 7.4) apresentaram semelhança no tamanho e agregação durante todo o período do experimento, com uma desagregação celular média que aumentou progressivamente de 48 horas até 72 horas ($p<0.001$) (Fig. 7B). Já os esferóides de células SCC25 cultivados em meio RPMI ácido (pH 6.8) exibiram 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 ($p<0.001$) (Fig. 7B).

Além disso, realizamos processamento das esferas de células SCC25 cultivadas isoladamente em meio DMEM F12, RPMI pH 7.4 e RPMI pH 6.8, seguido de posterior coloração com HE para elucidação histopatológica ao final do experimento (Fig. 7C). Vídeos de *time-lapse* mostrando os esferóides ao longo do tempos estão disponíveis em https://drive.google.com/drive/folders/1OUaBQWJapinR2_wih_TtYvhO5X0muEEU?usp=drive_link.

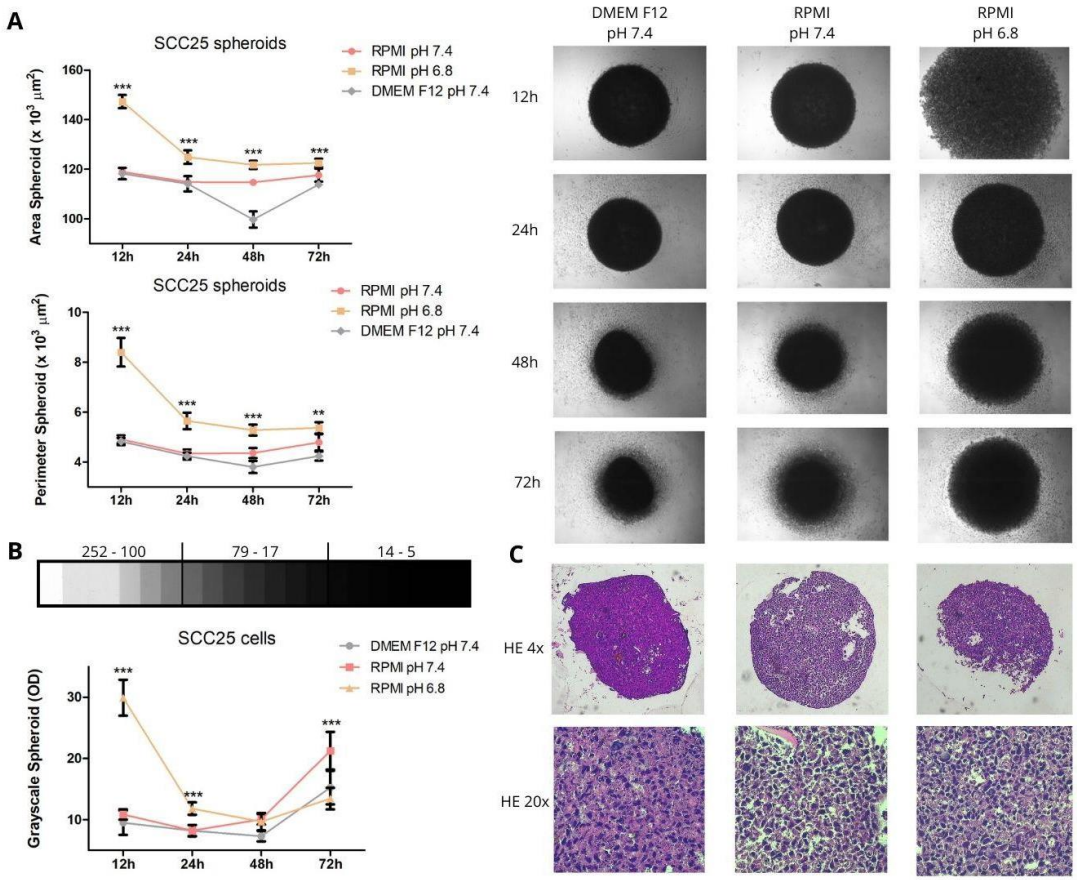


Figura 7. Modelo de cultura 3D para análise morfométrica da interação entre as células tumorais SCC25 em situação de co-cultivo com linfócitos T em meio neutro (controle - pH 7.4) e ácido (pH 6.8). A, mensuração de

área e perímetro nos tempos de 12h, 24h, 48h e 72h. B, avaliação da agregação celular através da análise de *optical density* (OD) em uma escala de cinza. C, aquisição de imagens histopatológicas coradas com HE ao final do experimento. (**) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.01$). (***) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.001$).

Modelo de cultura 3D indica que os linfócitos T alteram a organização das células tumorais SCC25

As esferas formadas pelo co-cultivo das células tumorais SCC25 com as células T expandiram significativamente suas áreas e perímetros nas duas condições experimentais, apesar das células em pH 6.8 seguirem demonstrando um padrão de crescimento ainda maior do que o pH 7.4 ($p<0.05$) (Fig. 8A). Em situação de co-cultivo, os esferóides compostos por células SCC25 e células T, tanto em pH neutro quanto ácido, iniciaram o experimento em 12 horas com um valor OD semelhante, e em ambas as condições os valores de OD aumentam progressivamente. Essa semelhança de valores se manteve constante, apesar dos esferóides em meio ácido apresentarem uma OD menor quando comparado ao meio com pH 7.4 ($p<0.001$), a qual se torna equivalente ao final de 72 horas (Fig. 8B). Não foi possível realizar o processamento das células formadas pelo co-cultivo devido à facilidade com que esses esferóides se desagregam. Vídeos de *time-lapse* mostrando a interação entre as células T em co-cultivo com as células tumorais estão disponíveis em: https://drive.google.com/drive/folders/1OUaBQWJapinR2_wih_TtYvhO5X0muEEU?usp=drive_link.

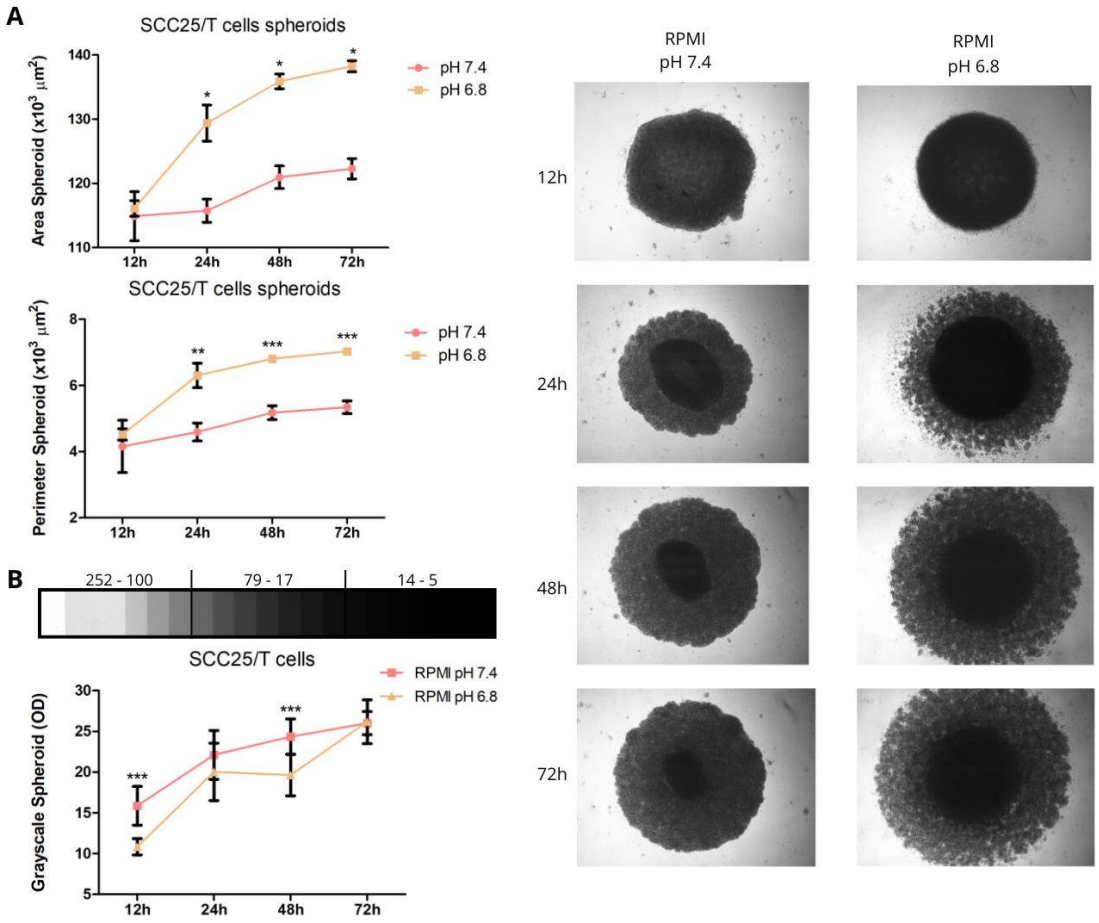


Figura 8. Modelo de cultura 3D para análise morfométrica da interação entre as células tumorais SCC25 em situação de co-cultivo com linfócitos T em meio neutro (pH 7.4) e ácido (pH 6.8). A, mensuração de área e perímetro nos tempos de 12h, 24h, 48h e 72h. B, avaliação da agregação celular através da análise de *optical density* (OD) em uma escala de cinza. (*) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.05$). (**) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.01$). (***) Diferença estatística entre os grupos ($p<0.001$).

Detecção de IFNγ e IL-2 através do ensaio de ELISA

A concentração de IFNγ e IL-2 nas amostras foi determinada comparando-se os valores das amostras com a curva padrão em um ensaio de ELISA. O nível de IFNγ secretado no sistema de co-cultivo das células SCC25 e T foi maior quando as células estavam expostas ao meio ácido (Fig. 9A), porém não foi estatisticamente significativo ($p>0.05$). Não foi detectada a presença de IFNy quando as células SCC25 ou T foram cultivadas isoladamente, tanto em pH 7.4 quanto pH 6.8.

Os níveis de IL-2 no meio de cultivo (Fig. 9B) aumentaram também nas células tumorais SCC25, tanto isoladamente quanto em co-cultivo sem e com pré-ativação quando expostas ao pH 6.8, porém novamente não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas. Não foi detectada a presença de IL-2 no meio das células T, tanto em pH neutro quanto ácido.

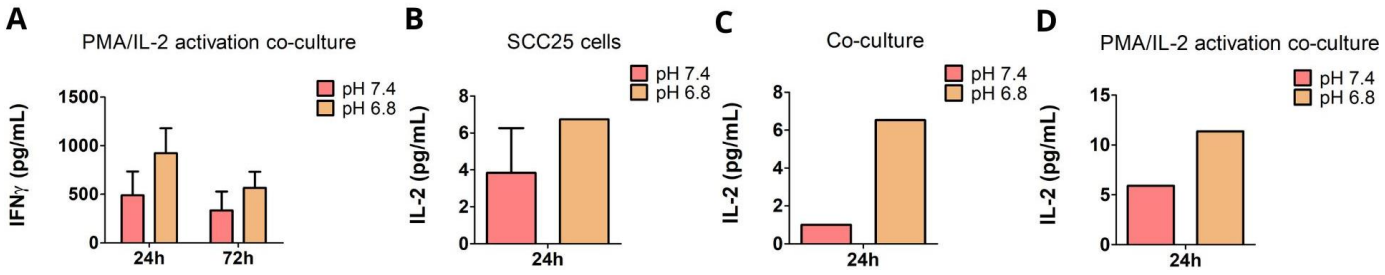


Figura 9. A, ensaio imunoenzimático Elisa para detecção das proteínas IFNγ nas linhagens de células SCC25 e células T, co-cultivo duplamente ativado. B, detecção de IL-2 nas células SCC25 em cultura isolada. C, detecção de IL-2 em co-cultivo sem ativação. D, detecção de IL-2 em co-cultivo com dupla ativação.

DISCUSSÃO

Os efeitos da acidez no MT do CEC bucal sobre a resposta imune antitumoral ainda não foram esclarecidos. Neste estudo, mostramos que a presença de um pH ácido altera a resposta das células T e SCC25, tanto isoladamente quanto em co-cultivo. Nossos resultados indicam que o estabelecimento de um MT ácido reduz a viabilidade e a capacidade proliferativa das células T, aumenta a apoptose e necrose dessas células e, em menor quantidade das células tumorais. Esses achados vão ao encontro de estudos anteriores, nos quais o ambiente ácido estabeleceu condições adversas que resultaram em danos irreversíveis ou morte celular, afetando tanto as células do sistema imunológico quanto as células tumorais sensíveis (ALLISON; COOMBER; BRIDLE, 2017; ZHANG et al., 2024).

A acidez do MT promoveu alterações fenotípicas nas células tumorais, além de aumento na expressão de marcadores TEM como a Vimentina após exposição ao pH 6.8 em comparação à condição padrão de pH 7.4. Esses dados confirmam o que já foi descrito em estudos anteriores, os quais afirmavam que as células tumorais capazes de tolerar esse estresse ácido provocado pelo MT demonstram maior agressividade, desenvolvem maior capacidade de invasão e migração, além de desencadearem aumento na expressão de marcadores

mesenquimais, adaptando-se à pressão seletiva induzida pela acidez extracelular e inclusive migrando de uma morfologia epitelial para fusiforme (DAMAGHI; GILLIES, 2017; MANI et al., 2008; PRUNES et al., 2022; SUTOO et al., 2020; SUZUKI et al., 2014). Essa característica é de extrema importância, visto que a capacidade das células tumorais de se espalharem para o estroma adjacente está associada à TEM e que esse fenômeno pode ajudar na eliminação de populações de células estromais vizinhas, permitindo o crescimento do tumor e a resistência a tratamentos (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2021).

Adicionalmente, as células tumorais em diferentes fases da TEM, com fenótipo epitelial e mesenquimal diferem em sua suscetibilidade ao ataque imunológico (DONGRE et al., 2017). Células tumorais com características mais mesenquimais possuem maior capacidade de evasão ao ataque imunológico e de indução de imunossupressão (CHUI, 2013; JIANG; ZHAN, 2020; ROMEO et al., 2019). Estudos *in vitro* demonstraram diferenças na resposta imune em tumores mamários de origem epitelial e mesenquimal de acordo com o status de TEM, sendo que os tumores com fenótipo mais epitelial foram mais sensíveis à imunoterapia em comparação com os tumores em TEM correspondentes (NOMAN et al., 2017).

Observamos que as células tumorais são mais resistentes à morte no meio ácido em relação às células T como já foi descrito em tumores malignos de mama, próstata, pulmão e melanoma (PEPPICELLI et al., 2015; ROFSTAD et al., 2006; SUTOO et al., 2020). Nossos resultados demonstram que no meio de cultura de pH 7.4 as células T conseguem controlar o crescimento das células SCC25 com ou sem pré-ativação. Esses achados vão ao encontro da teoria formulada por Burnet e pesquisadores nos primeiros estudos em imunologia, os quais afirmavam que pequenas populações de células tumorais poderiam ser regularmente eliminadas pelos linfócitos, impedindo a formação de tumores e estabelecendo o conceito de imunovigilância no contexto do câncer (BURNET, 1957, 1964, 1971). Entretanto, não se espera a mesma capacidade adaptativa nas células T, pois essa não é uma população heterogênea, nem apresenta aumento da resistência à morte celular como as células tumorais. Nesse contexto, nossos achados também enfatizam o quanto o pH ácido altera negativamente a capacidade citotóxica das células T contra as células SCC25 em um sistema de co-cultivo, o que sugere uma supressão do sistema imune nessa condição (FISCHER et al., 2007; WAN et al., 2022; XIA et al., 2017).

A interação e a comunicação intercelular intratumoral é crucial para o entendimento do MT (DOMINGUES et al., 2016; WU et al., 2019). Frente aos resultados referentes à

organização das células tumorais SCC25 e células T observados na cultura 3D, levantamos a hipótese de que as células T se concentram na periferia do tumor e possuam efeito antitumoral sobre as células SCC25, visto que os esferóides compostos pelo co-cultivo apresentaram maior dispersão das células, aumento da área e perímetro e consequente diminuição da parte compacta central, semelhante aos estudos *in vivo* disponíveis na literatura que descrevem principalmente infiltração peritumoral das células imunes em pacientes com tumores (LIN et al., 2021; SHAUL; FRIDLENDER, 2019). Além disso, as esferas controle formadas apenas pelas células tumorais SCC25 demonstraram uma coesão mais persistente e menor dispersão, ou seja, exibiam uma união mais estável das células. No entanto, as esferas cultivadas no meio com pH 6.8 demoraram mais para agregar de forma compacta, o que pode ser explicado em parte pelo processo de TEM desencadeado pelo meio ácido e aumento da expressão de vimentina. Após as primeiras 24 horas de adaptação, os esferóides em meio ácido se mantiveram mais estáveis do que os esferóides cultivados em meio pH 7.4 como podemos observar através da dispersão celular evidenciada pela escala de cinza. Isso coincide com achados da literatura que enfatizam o pior prognóstico e dificuldade no combate aos tumores sólidos com MT ácido, além de que a região central do tumor sabidamente têm menor acesso a nutrientes e oxigênio, apresentando necrose (HANIF et al., 2017; RUBENICH et al., 2023). Esses resultados sugerem que a localização da infiltração imune no tumor é de alta importância prognóstica e impacta sobre sua malignidade, e que a presença de linfócitos na região intratumoral está altamente associada ao controle da progressão e crescimento do câncer.

A terapia com alvo nos checkpoints imunológicos PD-1 (células T) e PD-L1 (células tumorais) ganhou importância significativa no tratamento contra o CEC bucal. Nesse contexto, PD-L1 é um ligante de PD1, encontrado em níveis elevados em diversos tumores malignos. A interação entre PD-1 e PD-L1 estabelece um mecanismo de checkpoint imunológico que restringe a ativação e a multiplicação das células T, desempenhando um papel regulador negativo na resposta imune celular. Isso permite que as células tumorais utilizem esse mecanismo para evadir a detecção do sistema imunológico, enquanto a regulação positiva da expressão de PD-L1 acentua essa evasão, promovendo a infiltração tumoral e a formação de metástases (DAI et al., 2023; SU et al., 2023; WANG et al., 2023). Nesse contexto, o êxito de fármacos que inibem a interação entre PD-1 e seu ligante PD-L1 tem impulsionado avanços significativos no tratamento imunoterápico do câncer ao longo da última década em ensaios clínicos e pré-clínicos. Não detectamos diferença na proporção de células SCC25 positivas para PD-L1 quando expostas ao meio com pH 6.8 em comparação com o meio neutro (pH 7.4),

sendo aproximadamente 90% das células positivas para esse marcador, o que já se esperava visto que o gene PD-L1 é sabidamente expresso de forma ampla em células tumorais (ARMAND et al., 2021; BELLMUNT et al., 2017; DAASSI; MAHONEY; FREEMAN, 2020; GIATROMANOLAKI et al., 2022; MOTZER et al., 2015; SCHMID et al., 2018; SIKIC et al., 2019; VOETS et al., 2019). Entretanto, esse resultado difere de dados já publicados anteriormente referentes a tumores malignos em outras regiões anatômicas, os quais relatam que a acidez do MT foi capaz de aumentar a expressão de PD-L1 em outras linhagens celulares de carcinoma espinocelular como orofaringe, melanoma e células de câncer de pulmão (ANGELIN et al., 2017; DANESHMANDI; WEGIEL; SETH, 2019; TRABOLD et al., 2003; VERMA; MESSERLI; MISKIMINS, 2020; YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2019). Com relação às células T cultivadas em pH 6.8, observamos uma diminuição discreta e não significativa de PD-1, o que também difere de estudos anteriores nos quais o meio acidificado com lactato (pH 6.6) levou as células T a aumentar sua expressão de PD-1, entrando em um estado de disfunção (BEROD et al., 2014).

A regulação da vigilância imune ocorre também através da secreção de citocinas tanto pelas células T quanto por células tumorais, que quando ativadas liberam mediadores químicos, incluindo IL-2 e IFNγ. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que ambas as citocinas podem ser liberadas pelas células imunes, e algumas células tumorais podem ter uma predileção pela liberação de IFNγ (ABBAS, 2020; RAHMAN et al., 2023). Com base nisso, é importante salientar o aumento dos níveis de IL-2 no meio de cultivo ácido (pH 6.8) com células tumorais SCC25 evidenciado em um período de 24 horas em nosso trabalho, tanto quando as células estavam isoladas quanto em co-cultivo sem e com a pré-ativação. Entretanto, autores relatam que o aumento da expressão gênica destas interleucinas no meio ácido em estudos *in vitro* ocorre a curto prazo (entre 3 e 6 horas) e acaba diminuindo com o passar do tempo, levando em consideração ainda o período de transcrição da proteína (RIEMANN; REIME; THEWS, 2017; ROSENBERG, 2014). A meia-vida curta da IL-2 tem efeitos prejudiciais sobre a resposta imune, uma vez que maiores quantidades dessa citocina estão associadas à sustentação da funcionalidade das células T, um aspecto essencial para as primeiras terapias imunológicas eficazes no tratamento do câncer humano (ROSENBERG et al., 2014). Adicionalmente, não observou-se a presença de IL-2 no meio de culturas individuais de células T, tanto em condições de pH neutro quanto ácido. Este achado está em conformidade parcial com estudos anteriores que indicaram que o ambiente ácido (pH 6,5) inibe as funções das células T, incluindo a secreção de IL-2 e a ativação de seus receptores, o que compromete as atividades antitumorais

visto que a eficácia das terapias imunológicas contra o câncer depende em grande parte da produção adequada de citocinas, o que pode ser limitado em condições hipóxicas ou acidose (CALCINOTTO et al., 2012; FISCHER et al., 2007; GILLIES et al., 1999; PENG et al., 2016; TANG; QIAO; FU, 2016). Esses resultados contraditórios sugerem que a regulação de interleucinas como IL-2 pelo MT depende do tipo celular e do período de acidificação.

As citocinas reguladoras influenciam na magnitude e duração da resposta citotóxica dos linfócitos T contra células neoplásicas, e sabe-se que a acidose extracelular está associada a uma atividade antitumoral prejudicada dessas células (LEQUERICA-FERNÁNDEZ et al., 2021; ZHANG et al., 2019; 2024). Estudos relatam que o IFNγ é um mediador imunológico com funções pró e antitumorais concomitantes, sendo que no último caso sua presença está ligada à inibição da proliferação de células tumorais e angiogênese, o que contribui para uma melhor sobrevivência em pacientes com CEC. Considerando isso, é importante ressaltar que sua expressão é induzida principalmente por citocinas como a IL-18 e IL-12, expressas particularmente por células T e NK, e que atuam por meio da ativação das vias de sinalização STAT1 e STAT3, as quais regulam a expressão de milhares de genes que codificam proteínas efetoras e que medeiam efeitos imunorreguladores intrínsecos e extrínsecos das células tumorais (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; BRAND et al., 2016; KOUIDHI et al., 2016; LEQUERICA-FERNÁNDEZ et al., 2021; MAZET et al., 2023; MYERS; MILLER, 2021; PARKER; RAUTELA; HERTZOG, 2016; SHI et al., 2022; WAN et al., 2022; ZHANG et al., 2024). Nossos resultados demonstraram aumento dos níveis de IFNγ secretado no sistema de co-cultivo das células SCC25 e células T expostas ao meio ácido, apesar de não ter sido identificada diferença estatisticamente significativa. Além disso, não foi detectada a presença de IFNγ quando as células SCC25 ou T foram cultivadas isoladamente, tanto em pH 7.4 quanto pH 6.8. Esses resultados vão parcialmente de encontro com a literatura, a qual afirma através de estudos *in vitro* que o ambiente ácido pode prejudicar a expressão de várias citocinas, incluindo IFNγ, e causar anergia dos linfócitos T quando cultivados de forma isolada, além de contribuir para aumentar a expressão de IFNγ durante o co-cultivo dessas células imunes com células tumorais, sugerindo que esse desfecho estaria associado à capacidade das células tumorais em secretar fatores biológicos que estimulam a secreção de IFNγ associado à IL-18, aumentando a expressão de PD-L1 que é induzida por essa citocina via expressão gênica de STAT1 em células tumorais agressivas e consequentemente favorecendo o escape imunológico (FISCHER et al., 2007; KNOPF et al., 2023; SHARMA; KAUR, 2023; WANG et al., 2020). Esses resultados sugerem que a acidez aguda do microambiente tumoral poderia prejudicar o

desempenho das células imunes e diminuir a resposta antitumoral mediada por IFN-γ, agindo como uma barreira entre células T e tumorais.

Com base nessas descobertas e na escassa existência de estudos que enfatizam a influência da acidez no MT do CEC bucal, é essencial destacar os estudos *in vivo* que já evidenciam a capacidade das terapias existentes de reverter a acidose em outros tumores, resultando em uma redução no crescimento do tumor e diminuindo o risco de metástase, o que consequentemente aumenta a sobrevida dos pacientes (DA SILVA et al., 2018; ROBEY et al., 2009). Aprofundar nosso entendimento nesse aspecto é de suma importância para avançarmos nas estratégias terapêuticas personalizadas, especialmente para subpopulações tumorais mais agressivas e resistentes (SADEGHI et al., 2020). O progresso no conhecimento gerado nessa área traduz-se clinicamente em uma compreensão mais abrangente dos processos e elementos relacionados à malignidade tumoral, influenciando diretamente na capacidade de prever prognósticos clínicos favoráveis ou desfavoráveis.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos achados revelam que a acidez no MT do CEC bucal promove alterações celulares importantes que estão diretamente associadas ao sucesso do tratamento oncológico. Foi demonstrado que o MT ácido é capaz de induzir um fenótipo celular mais agressivo nas células tumorais, que inclui aumento da expressão de marcadores TEM, além de diminuir a viabilidade das células T, a sua capacidade proliferativa e aumentar o número dessas células apoptóticas e necróticas. A acidez extracelular ainda contribuiu para uma maior resistência das células tumorais à morte induzida pelas células T. Além disso, o ambiente ácido aumentou a secreção de IFNγ e IL-2 durante o sistema de co-cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

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.

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.

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.

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

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.

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; 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.

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.

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.

GIATROMANOLAKI, A et al. Expression of CD47 and SIRPα 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.

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.

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.

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

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

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.

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. 25(1):2315655, 2024.

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.

LIN, Y. J et al. Roles of neutrophils in glioma and brain metastases. Front Immunol, 701383, 2021.

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. IFNγ 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.

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.

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.

PARKER, B. S; RAUTELA, J; HERTZOG, P. J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 16(3):131-44, 2016.

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 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.

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.

RAHMAN, A et al. Immunotherapy Enhancement by Targeting Extracellular Tumor pH in Triple-Negative Breast Cancer Mouse Model. Cancers (Basel). 15(20):4931, 2023.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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, 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.

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.

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.

VOETS, E et al. Functional characterization of the selective pan-allele anti-SIRPα antibody ADU-1805 that blocks the SIRPα–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.

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

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.

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.

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

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-HIF1α 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.

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 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-κB 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 Identi fi es 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 Classifcation of Head and Neck Tumours, IARC Who Classifcation 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 SIRPα 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 IFNγ 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-2α–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. IFNγ 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-SIRPα antibody ADU-1805 that blocks the SIRPα–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. el 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-κB 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-HIF1α 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.