

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 30/03/2028.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Danilo Paschoal Ferrarezi

**Eferocitose e fenótipo de macrófagos associados ao tumor (TAM) no
carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)**

Araraquara

2026



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Danilo Paschoal Ferrarezi

**Eferocitose e fenótipo de macrófagos associados ao tumor (TAM) no
carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Periodontia, na Área de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior
Coorientadora: Dra. Ianny Brum Reis

Araraquara

2026

F374e

Ferrarezi, Danilo Paschoal

Eferocitose e fenótipo de macrófagos associados ao tumor (TAM)
no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) /
Danilo Paschoal Ferrarezi. -- Araraquara, 2026

111 p. : tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Carlos Rossa Junior

Coorientadora: Ianny Brum Reis

1. Eferocitose. 2. Macrófagos associados a tumor. 3. Carcinoma de
células escamosas de cabeça e pescoço. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A investigação em imunologia tumoral aplicada ao processo metastático do câncer de cabeça e pescoço possui relevante impacto social, dada a elevada morbidade e mortalidade associadas a esses tumores, que frequentemente comprometem funções essenciais como fala, deglutição e estética facial. O aprofundamento no entendimento dos mecanismos imunológicos que regulam a progressão e a disseminação metastática permite o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e personalizadas, contribuindo para a redução da mortalidade, a melhoria da qualidade de vida dos pacientes e a otimização dos recursos em saúde pública. Além disso, esses avanços podem subsidiar políticas de prevenção, diagnóstico precoce e investigação de tratamentos inovadores, promovendo benefícios clínicos, sociais e econômicos substanciais à sociedade.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Research in tumor immunology applied to the metastatic process of head and neck cancer carries significant social impact, given the high morbidity and mortality associated with these tumors, which often compromise essential functions such as speech, swallowing, and facial aesthetics. Advancing the understanding of the immunological mechanisms that govern tumor progression and metastatic dissemination enables the development of more effective and personalized therapeutic strategies, contributing to reduced mortality, improved patient quality of life, and optimized allocation of public health resources. Furthermore, this knowledge may be of value for prevention policies, early diagnosis, and for the investigation of innovative treatments, thereby delivering substantial clinical, social, and economic benefits to society.

Danilo Paschoal Ferrarezi

**Eferocitose e fenótipo de macrófagos associados ao tumor (TAM) no
carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)**

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

2º Examinador: Profa. Dra. Claudia Maria Navarro

3º Examinador: Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

4º Examinador: Profa. Dra. Marianne de Vasconcelos Carvalho

Araraquara, 30 de março de 2026.

DADOS CURRICULARES

Danilo Paschoal Ferrarezi

NASCIMENTO: 20 de setembro de 1986 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Mãe – Sirlei Aparecida Paschoal; Pai – Antônio Carlos Ferrarezi

2004-2008: Bacharel em Administração. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAVj, campus de Jaboticabal/SP.

2015-2020: Bacharel em Odontologia. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, campus de Araraquara/SP.

2021-2023: Pós-graduação *Lato Sensu* – Especialização em Periodontia. Faculdade de Odontologia da APCD – FAOA, campus de Araraquara/SP.

2021-2023: Pós-graduação *Lato Sensu* – Especialização em Implantodontia. Faculdade de Odontologia da APCD – FAOA, campus de Araraquara/SP.

2024-2025: Pós-graduação *Lato Sensu* – Especialização em Infectologia. Centro Universitário Internacional - UNINTER, campus de Araraquara/SP.

2024-2025: Pós-graduação *Lato Sensu* – Especialização em Oncologia e Hematologia. Centro Universitário Internacional - UNINTER, campus de Araraquara/SP.

2022-atual: Pós-graduação *Stricto Sensu* – Doutorado em Odontologia. Área de Concentração: Periodontia. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, campus de Araraquara/SP.

Dedico este trabalho aos meus memoráveis Professores que, desde a infância — quando a curiosidade ainda se confunde com assombro —, me conduziram pelos caminhos da investigação, da materialidade dos fatos e da sempre inquieta busca pela verdade. Faço-o, de modo personalíssimo, à Professora Doutora Claudia Maria Navarro, docente da disciplina de Estomatologia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, cuja generosidade ontológica, honestidade intelectual e amparo constante, não apenas lançaram luz sobre esta jornada, mas lhe conferiram direção quando a claridade parecia insuficiente, fazendo-se condição discreta — e, ainda assim, decisiva — para que esta Tese de Doutorado chegasse a termo.

Dedico este trabalho à minha sogra, Alaíde Honorina de Souza, idosa, negra, nordestina e analfabeta, cuja grandeza de alma sobrepuja todos os títulos que poderei acumular em minha trajetória; mulher que não precisou saber ler ou escrever para me ensinar que o único, e maior, valor da vida é a capacidade de ser generoso com o próximo.

Àqueles que, com a circunspeção própria das reservas não declaradas, duvidaram e obstaculizaram minha trajetória, mas que, paradoxalmente, terminaram por impulsionar minha busca pelo aperfeiçoamento intelectual.

Dedico àqueles que, entre gestos de estímulo e votos generosos — alguns talvez mais convictos que outros —, concorreram para que eu viesse a integrar essa nobre fração da sociedade que oficialmente se ocupa da defesa da verdade, do método e da sempre proclamada imparcialidade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado marido, Alexandre Carlos de Souza, que, com a compaixão serena dos que amparam sem alarde e a compreensão própria dos que permanecem, transforma meus dias árduos em sendas mais brandas e converte meus obstáculos em desafios partilhados; que acolhe meus sonhos como se seus fossem e acompanha, com entusiasmo inabalável, cada passo desta busca.

À minha Mãe, presença firme e discreta, guardiã silenciosa que sustentou meus sonhos com a perseverança dos que não recuam e a coragem dos que creem, ainda quando o peso não lhes pertence por inteiro.

Às minhas amigas e cúmplices de ciência e de vida, Ianny Brum Reis e Milena Moraes de Carvalho, cuja inteligência destacável e apoio incondicional não apenas pavimentaram meus caminhos, mas lhes conferiram solidez e sentido. A elas, pelo respeito que edifica e pela cumplicidade que sustenta.

À minha coorientadora, Professora Doutora Ianny Brum Reis, cuja excelência acadêmica, lucidez crítica e profunda sensibilidade humanitária transcendem o exercício da orientação, tornando-se verdadeira inspiração. Sua generosidade intelectual e seu amparo constante conferiram densidade e significado a esta jornada. A ela, minha gratidão permanente e reverente.

Ao meu orientador, Professor Carlos Rossa Junior, pela constante deferência aos meus próprios critérios e pela generosa liberdade que me foi concedida ao longo desta trajetória, circunstâncias que, a seu modo, contribuíram para que minhas habilidades encontrassem, por si, espaço para amadurecer.

Aos médicos, Professor Doutor Flávio Ferlin Arbex e Professor Alex de Freitas Porsani, profissionais da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara, pela valiosa contribuição técnica e pelo comprometimento na condução da abordagem funcional junto aos pacientes oncológicos, colaboração indispensável à concretização deste estudo.

Aos pacientes que, com generosidade e coragem, participaram voluntariamente desta pesquisa, confiando-nos seu tempo e seu material biológico. Sua contribuição foi não apenas fundamental para o desenvolvimento científico deste trabalho, mas também expressão de nobreza e compromisso com o avanço do conhecimento.

Ao Sistema Único de Saúde (SUS) e às Universidades Públicas brasileiras, pilares da ciência nacional e guardiões do direito universal à dignidade, por sustentarem, com seus princípios e sua missão social, o florescimento da pesquisa científica e a formação de pesquisadores comprometidos com o bem coletivo.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2022/01041-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

“A maior riqueza do homem é a sua incompletude.

Nesse ponto sou abastado.

Palavras que me aceitam como sou – eu não aceito.

Não aguento ser apenas um sujeito que abre portas, que puxa válvulas, que olha o relógio, que compra pão às seis horas da tarde, que vai lá fora, que aponta o lápis, que vê a uva etc. etc.

Perdoai.

Mas eu preciso ser Outros.

Eu penso renovar o homem usando borboletas.”

Manoel de Barros*

* Barros, Manoel de. Retrato do artista quando coisa. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Record, 1998.

Ferrarezi DP. Eferocitose e fenótipo de macrófagos associados ao tumor (TAM) no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2026.

RESUMO

Apoptose é um evento comum no microambiente do câncer de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), podendo resultar da hipóxia e escassez de nutrientes em partes da lesão, ou do próprio tratamento citotóxico. Assim, conceitualmente a remoção das células apoptóticas por meio da eferocitose deve ser um processo relevante e muito ativo neste microambiente. Um processo imunologicamente silencioso que pode ser realizado por diversas células e depende fundamentalmente do reconhecimento da externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática das células apoptóticas. Os macrófagos são o tipo celular imune mais prevalente no microambiente tumoral (TME) e as principais células fagocíticas. Rac1 é uma pequena GTPase com papel crucial na reorganização do citoesqueleto, essencial para diversos processos celulares, incluindo a eferocitose/fagocitose. O perfil fenotípico M2/alternativo de macrófagos está associado à maior atividade de eferocitose, e ao pior prognóstico de HNSCC. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de eferocitose de macrófagos, considerando 1. sua relativa abundância no TME de HNSCC em relação a outros leucócitos; e 2. A relativa escassez de informações sobre a relevância da eferocitose para a evolução e prognóstico deste tipo de câncer. A hipótese central deste trabalho é que a atividade de eferocitose no TME tem papel importante na progressão e disseminação de HNSCC. No experimento *in vivo*, utilizamos um modelo de xenoenxerto ortotópico de carcinoma oral de células escamosas (OSCC) em camundongos atímicos/nude. A atividade de eferocitose foi modulada experimentalmente com Bavituximab (anticorpo monoclonal que impede o reconhecimento da fosfatidilserina exposta na membrana plasmática de células apoptóticas pelas células fagocíticas) e NSC23766 (inibidor bioquímico de Rac1) administrados via intratumoral. Também avaliamos amostras de tumores primários de uma coorte de pacientes de HNSCC, investigando a associação entre a prevalência de eventos de eferocitose com dados clínicos, histopatológicos e com o perfil transcriptômico. Os resultados demonstraram que a administração intratumoral de Bavituximab, mas não de NSC23766, aumentou a sobrevida dos animais. Tanto Bavituximab quanto NSC23766 aumentaram o peso e volume dos tumores experimentais, porém sem alteração significativa na atividade de eferocitose. Bavituximab reduziu a prevalência de macrófagos no TME, enquanto NSC23766 promoveu aumento significativo do infiltrado leucocitário, sem influenciar o fenótipo dos macrófagos. Na coorte de pacientes de HNSCC, a atividade de eferocitose teve correlação negativa com o infiltrado de macrófagos (CD68+). Isoladamente, a atividade de eferocitose não é um marcador prognóstico relacionado à sobrevida em HNSCC relevante. Foram detectados 51 genes diferencialmente expressos (61.5% com expressão aumentada), incluindo 8 genes de RNA não codificante (destes, 7 genes de RNA longo não codificante / lncRNA gene). Análise de ontologia dos genes de expressão aumentada nos casos de maior atividade de eferocitose identificou processos como “regulação positiva de proliferação celular”, “queratinização”, “regulação positiva de PI3K/PKB” e “regulação negativa de sinalização via Wnt”. A análise de ontologia dos genes de expressão reduzida nos casos de alta atividade de eferocitose identificou os processos “regulação negativa da sinalização de BMP” e “regulação da estabilidade proteica”.

Palavras-chave: Eferocitose; Macrófagos associados a tumor; Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

Ferrarezi DP. Efferocytosis and tumor-associated macrophage (TAM) phenotype in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2026.

ABSTRACT

Apoptosis is a common event in the microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and may result from hypoxia and nutrient deprivation in certain regions of the lesion, or from cytotoxic treatment itself. Thus, efferocytosis is expected to be a relevant and highly active process in this microenvironment. Efferocytosis is immunologically silent and can be performed by several cell types, however, macrophages are the main phagocytic cells. Macrophages also represent the most prevalent immune cell type in the tumor microenvironment (TME) of HNSCC. The M2/alternatively activated macrophage phenotype is associated with higher efferocytic activity and with a poor prognosis in HNSCC. The objective of this study was to evaluate macrophage efferocytosis activity, considering their relative abundance in the HNSCC TME compared with other leukocytes and the evidence of their relevance to the progression and prognosis of this type of cancer. We developed an in vivo orthotopic xenograft model of oral squamous cell carcinoma (OSCC) in Balb/c nude mice treated intratumorally with Bavituximab and the Rac1 inhibitor (NSC23766) and assessed whether inhibition of efferocytosis reduces tumor aggressiveness (invasion, growth, and dissemination/metastasis), in addition to changes in macrophage phenotype. We also performed an ex vivo analysis of primary tumors from HNSCC patients obtained from resective surgeries and evaluated whether the percentage of efferocytosis events correlated with clinical and histopathological data, as well as with differentially expressed genes assessed by bulk RNA sequencing. The results demonstrated that treatment of experimental tumors with Bavituximab increased animal survival rates, although, similarly to Rac1 inhibition, it promoted increased tumor weight and volume. Local treatment with either Bavituximab or NSC23766 did not alter the efferocytosis rate in experimental tumors. However, local treatment with Bavituximab reduced the population of tumor-associated macrophages, whereas treatment with the Rac1 inhibitor (NSC23766) promoted a significant increase in the total leukocyte population but did not alter the polarization of tumor-associated macrophages. In the evaluated HNSCC cohort, efferocytosis showed a negative correlation with CD68+ macrophage infiltrate, and survival results suggest that efferocytosis alone may not act as an independent prognostic factor in this patient set. Gene expression results showed that although global transcriptome analysis did not reveal a clear separation between groups, the application of a log2 fold-change based cutoff allowed the identification of differentially expressed genes associated with high and low efferocytosis. Tumors with high efferocytosis showed strong regulation of genes associated with cellular signaling and growth pathways, cellular organization and communication, as well as processes related to the tumor microenvironment and immunomodulation, in contrast, these tumors exhibited reduced expression of genes associated with tumor immunogenicity.

Keywords: Efferocytosis; Tumor-associated macrophages; Squamous cell carcinoma of head and neck.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Epidemiologia, Fatores de Risco e Prevenção do Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (HNSCC)	17
3.2 Abordagens Terapêuticas e Limitações	21
3.3 Papel da Eferocitose em Câncer	23
3.4 Tipos de Morte Celular	25
3.4.1 Apoptose (morte celular tipo I, não imunogênica).....	26
3.4.2 Autofagia (morte celular tipo II, não imunogênica).....	27
3.4.3 Necrose (morte celular tipo III, imunogênica)	29
3.4.4 Piroptose (imunogênica).....	30
3.5 Eferocitose	31
3.5.1 Reconhecimento de alvos por fagócitos: sinais “eat-me” e “don’t eat me”	33
3.5.2 CD47–SIRPα: eixo inibitório clássico da fagocitose	36
3.5.3 CD31 (PECAM-1): sinal de preservação celular e inibição da fagocitose	36
3.6 Alterações Morfológicas na Estrutura dos Fagócitos	37
3.6.1 Fosfatidiserina e bavituximab.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Modelo de Estudo In Vivo	42
4.1.1 Design experimental.....	42

4.1.2 Avaliação da eferocitose in situ	43
4.1.3 Citometria de fluxo para avaliação do fenótipo de macrófagos associados ao tumor.....	44
4.2 Estudo de Associação Ex Vivo.....	44
4.2.1 Amostras de HNSCC e dados epidemiológicos da coorte	44
4.2.2 Avaliação da eferocitose em amostras de tumores primários de HNSCC	45
4.2.3 Dados transcriptômicos (bulk RNAseq)	45
4.3 Análises Estatísticas	46
 5 RESULTADOS.....	 48
5.1 A Administração Intra-tumoral de Bavituximab ou NSC23766 Aumentou o Peso e Volume dos Tumores Experimentais	48
5.2 A Administração Intra-tumoral de Bavituximab ou NSC23766 Não Influenciou a Atividade de Eferocitose nos Tumores Experimentais	50
5.3 Bavituximab Reduziu a Prevalência de Macrófagos no Microambiente Tumoral, enquanto o Inibidor de Rac1 (NSC23766) Aumentou o Infiltrado de Leucócitos Totais.....	50
5.4 Coorte de Pacientes de HNSCC	52
5.5 A Atividade de Eferocitose foi Negativamente Correlacionada com o Infiltrado de Macrófagos (CD68+). A Atividade de Eferocitose, Isoladamente, não foi Relacionada ao Prognóstico do Caso ou à Agressividade do Tumor.....	54
5.6 Análise Transcriptômica de HNSCC com Alta e Baixa Atividade de Eferocitose.....	55
 6 DISCUSSÃO	 60
 7 CONCLUSÃO	 68
 REFERÊNCIAS	 69

APÊNDICES.....	82
-----------------------	-----------

ANEXOS.	104
---------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço ocupa, atualmente, a sexta posição entre os tipos mais prevalentes de câncer no mundo. O sítio anatômico mais afetado é a cavidade oral, seguido por orofaringe, hipofaringe e laringe, com 96% dos casos identificados como carcinomas de células escamosas. A cirurgia ressectiva seguida por tratamento com quimio e radioterapias são a principal forma de tratamento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC). Apesar dos dados não evidenciarem benefícios importantes no uso das terapias citotóxicas para a sobrevida dos pacientes, estas são amplamente empregadas no manejo dos casos de HNSCC. Além dos mecanismos de resistência ao agente quimioterápico, as terapias citotóxicas ainda apresentam importantes efeitos adversos sistêmicos, incluindo influências gastrointestinais, cutâneas, hepáticas, cardiovasculares, no sistema reprodutor/endócrino e imunológicas; e efeitos adversos locais, com a indução de morte celular de forma não-específica.

Outras abordagens terapêuticas vêm sendo investigadas, como imunoterapias e inibidores de *checkpoints* imunológicos, contudo, os resultados não são satisfatórios em termos do percentual de pacientes responsivos e magnitude do benefício clínico, além do alto custo. A eficácia abaixo do esperado das novas abordagens terapêuticas está relacionada, ao menos em parte, ao diagnóstico tardio (a maior parte dos casos de HNSCC é diagnosticada em estágios avançados) e à heterogeneidade molecular / fenotípica. A identificação de características e especificidades histopatológicas, celulares e moleculares é proposta como criticamente importante para os níveis de resposta das novas terapias.

Atualmente, as terapias citotóxicas continuam sendo utilizadas como padrão-ouro. O objetivo das terapias citotóxicas é a indução de morte celular, sendo a apoptose um tipo de morte celular frequentemente associado à quimio e radioterapia. Considerando que a presença de células imunes no microambiente tumoral tem implicação importante para o prognóstico de HNSCC e é criticamente importante para o sucesso das imunoterapias, os tipos de morte celular imunogênicos (necrose, [piroptose, ferroptose]) seriam mais interessantes para favorecer o resgate da resposta antitumoral, pois estão associados à liberação do conteúdo citoplasmático e fragmentos celulares (*Damage-Associated Molecular Patterns* - DAMPs), que estimulam o infiltrado leucocitário e a resposta inflamatória. A apoptose é um tipo de

morte celular não imunogênico relacionado também a processos de fisiológicos de renovação tecidual, e é um evento frequente no microambiente tumoral, tanto devido à hipóxia ou privação de nutrientes quanto como resultado dos tratamentos citotóxicos.

Assim, no microambiente tumoral, a eferocitose é considerada um processo prevalente devido à quantidade de células apoptóticas, e o fato de ser um processo imunologicamente silencioso pode favorecer a imunoevasão e progressão do tumor ao proporcionar um ambiente imunotolerante e/ou imunossupressivo. A inibição da eferocitose também é estudada como um adjuvante das imunoterapias uma vez que as células apoptóticas não eferocitadas entram em processo de necrose secundária, com perda de integridade da membrana plasmática e extravasamento dos componentes citoplasmáticos (citocinas, DAMPs), os quais desencadeiam uma resposta imune/inflamatória. A elevada atividade de eferocitose pode ter efeitos “pró-tumorais” ao levar a um aumento compensatório da proliferação celular, da angiogênese e da produção de mediadores tolerogênicos e/ou imunossupressores.

As informações sobre a ocorrência e possível influência da eferocitose em câncer de cabeça e pescoço são praticamente inexistentes na literatura. Compreender a influência da eferocitose em HNSCC é importante, considerando que existe suporte racional-científico para um papel relevante da eferocitose no microambiente tumoral (TME) influenciando a progressão do tumor; além do potencial da inibição da eferocitose como estratégia de modulação da resposta imune no TME como adjuvante terapêutico. Desta forma, uma melhor compreensão da possível influência da atividade de eferocitose no TME de HNSCC pode informar sobre mecanismos biológicos relevantes para a progressão deste tipo de neoplasia, gerando informações sobre a utilidade deste processo como marcador de agressividade e sobre o potencial terapêutico da modulação deste processo em HNSCC.

Neste sentido, considerando que os macrófagos são as principais células envolvidas no processo de eferocitose e sua relevância e abundância no TME de HNSCC, o presente estudo avaliou a atividade de eferocitose de macrófagos e a relevância da eferocitose para a evolução e prognóstico de HNSCC. Para isso, foi utilizado um modelo *in vivo* de xenoenxerto ortotópico de carcinoma oral de células escamosas (OSCC) em camundongos atímicos/nude. Bavituximab e NSC23766 (inibidor bioquímico de Rac1) foram administrados via intratumoral com o objetivo de inibir a atividade de eferocitose. Em uma coorte de pacientes de HNSCC tratados no

hospital Santa Casa de Araraquara, verificamos a associação entre a atividade de eferocitose e dados clínicos, histopatológicos, e o perfil transcriptômico.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que, embora a eferocitose seja um processo biologicamente relevante no microambiente tumoral do HNSCC, de forma isolada não está associada à agressividade tumoral ou tem relevância como fator prognóstico. Entretanto, no modelo experimental empregado, a utilização de inibidores de fosfatidilserina, como o Bavituximab, evidenciou efeitos biológicos relevantes sobre o microambiente tumoral, com impacto sobre a diferenciação tumoral, a vascularização e, principalmente na modulação do infiltrado e do fenótipo de macrófagos associados ao tumor, refletindo efeitos biológicos relevantes mesmo na ausência de redução do crescimento tumoral. De forma complementar, a análise da coorte clínica corroborou que a eferocitose não apresenta associação direta com parâmetros clínico-patológicos clássicos ou sobrevida, embora esteja relacionada a perfis transcriptômicos específicos e a modificações na composição do infiltrado imune, indicando seu papel como modulador do ecossistema tumoral. Esses achados reforçam que a eferocitose deve ser compreendida como um processo contextual e integrado ao microambiente tumoral, destacando o potencial dos inibidores de fosfatidilserina como estratégias adjuvantes no tratamento do HNSCC, e, portanto, estudos adicionais são necessários para elucidar seus mecanismos de ação e validação em estudos translacionais futuros.

Especificamente em relação à proposta do trabalho:

- I. A hipótese central de que a eferocitose no microambiente tumoral do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) tem influência na progressão / agressividade foi rejeitada pelo estudo de associação com coorte de pacientes, e não foi conclusivamente confirmada ou rejeitada no estudo *in vivo*;
- II. A hipótese secundária de que a influência da eferocitose na progressão de HNSCC ocorre por meio da modulação da resposta imune no microambiente tumoral também foi parcialmente rejeitada, uma vez que não observamos influência da eferocitose na progressão ou agressividade de HNSCC ; porém a administração de compostos moduladores de eferocitose no estudo experimental e a atividade de eferocitose no microambiente tumoral nos pacientes incluídos na coorte foram associados a efeitos imunomodulatórios no microambiente tumoral de HNSCC.

REFERÊNCIAS

1. Miniuk M, Reszeć-Giełżyn J, Bortnik P, Borsukiewicz A, Mroczek A. Novel predictive biomarkers in the head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Clin Med*. 2024; 13(19): 5876.
2. Brasil. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Síntese de resultados e comentários [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2023 [citado 2025 out 30]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>
3. Khijmatgar S, Yong J, Rübsamen N, Lorusso F, Rai P, Cenzato N et al. Salivary biomarkers for early detection of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and head/neck squamous cell carcinoma (HNSCC): a systematic review and network meta-analysis. *Jpn Dent Sci Rev*. 2024; 60: 32-9.
4. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: cancer Today [Internet]. Lyon (FR): IARC; 2025 [citado 2025 out 30]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group_populations=0&cancers=1&populations=76&types=1&sexes=1
5. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil: câncer de cavidade oral. [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2022 [citado 2025 out 30]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>
6. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil — síntese de resultados e comentários [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2022 [citado 2025 out 30]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>
7. International Agency for Research on Cancer. SURVCAN — Bar charts: cancer survival statistics [Internet]. Lyon (FR): IARC; [cited in: 2025 out 30]. Available from: https://gco.iarc.fr/survival/survcan/dataviz/bars?multiple_populations=0&sort_by=value1&survival=5&cancers=20&values_position=in&mode=cancer&populations=76
8. Santos FM, Viani GA, Pavoni JF. Evaluation of survival of patients with locally advanced head and neck cancer treated in a single center. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2021; 87(1): 3-10.
9. Tuyns A.-J., Esteve J., Raymond L., Berrino F., Benhamou E., Blanchet F. et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer*. 1988; 41(4): 483–491.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver

10. Parkin D.M. 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *Br J Cancer*. 2011; 105 Suppl2: S6–S13.
11. Wang JB, Jiang Y, Liang H, Li P, Xiao HJ, Ji J et al Attributable causes of cancer in China. *Ann Oncol*. 2012; 23(11): 2983-9.
12. Lee YCA, Li S, Chen Y, Li Q, Chen CJ, Hsu WL et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, betel quid chewing, and risk of head and neck cancer in an East Asian population. *Head Neck*. 2019; 41(1): 92-102.
13. Morita S., Yano M., Tsujinaka T., Akiyama Y., Taniguchi M., Kaneko K. et al. Genetic Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1999; 80(5): 685–8.
14. Wyss A.B., Herring A.H., Avery C.L., Weissler M.C., Bensen J.T., Barnholtz-Sloan J.S. et al. Single-nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes, cigarette smoking, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013; 22(8): 1428–1445.
15. Wyss A., Hashibe M., Chuang S.C., Lee Y.C.A., Zhang Z.F., Yu G.P. et al. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Am J Epidemiol*. 2013; 178(5): 679–690.
16. Troy J.D., Grandis J.R., Youk A.O., Diergaarde B., Romkes M., Weissfeld J.L. Childhood passive smoke exposure is associated with adult head and neck cancer. *Cancer Epidemiol*. 2013; 37(4): 417–423.
17. Zandberg D.P., Liu S., Goloubeva O., Ord R., Strome S.E., Suntharalingam M. et al. Oropharyngeal cancer as a driver of racial outcome disparities in squamous cell carcinoma of the head and neck: 10-year experience at the University of Maryland Greenebaum Cancer Center. *Head Neck*. 2016; 38(4): 564–572.
18. Castellsagué X., Quintana M.J., Martínez M.C., Nieto A., Sánchez M.J., Juan A. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2003; 108(5): 741–9.
19. Hashibe M., Brennan P., Benhamou S., Castellsagué X., Chen C., Curado, M.P. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99(10): 777–789.
20. Runggay H., Murphy N., Ferrari P., Soerjomataram I. Alcohol and cancer: epidemiology and biological mechanisms. *Nutrients*. 2021; 13(9): 3173.

21. Yu C.-C., Lo W.-L., Chen Y.-W., Huang P.-I., Hsu H.-S., Tseng L.-M., et al. Bmi-1 regulates snail expression and promotes metastasis ability in head and neck squamous cancer-derived ALDH1 positive cells. *J Oncol.* 2011; 2011: 609259.
22. Blot WJ, McLaughlin Jk, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Susan S et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988; 48(11): 3282-7.
23. Voltzke KJ, Lee Y-CA, Zhang Z-F, Zevallos JP, Yu G-P, Winn DM et al. Racial differences in the relationship between tobacco, alcohol, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis of US studies in the INHANCE Consortium. *Cancer Causes Control.* 2018; 29(7): 619-630.
24. Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012; 13(6): 607-615.
25. Varier I, Keeley BR, Krupar R, Patsias A, Dong J, Gupta N et al. Clinical characteristics and outcomes of oropharyngeal carcinoma related to high-risk non-human papillomavirus16 viral subtypes. *Head Neck.* 2016; 38(9): 1330-7.
26. Zhang S, Wang B, Ma F, Tong F, Yan B, Liu T et al. Characteristics of B lymphocyte infiltration in HPV⁺ head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2021; 112(4): 1402-1416.
27. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol.* 2013; 31(36): 4550-9.
28. Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer.* 2017; 123(12): 2219-2229.
29. Elrefaey S, Massaro MA, Chiocca S, Chiesa F, Ansarin M. HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 2014; 34(5): 299-309.
30. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E et al. Human Papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011; 29(32): 4294-4301.
31. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363(1): 24-35.
32. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(4): 261-9.

33. Bosetti C, Carioli G, Santucci C, Bertuccio P, Gallus S, Garavello W et al. Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*. 2020; 147(4): 1040-9.
34. Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol*. 2020; 102: 104551.
35. Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis*. 2019; 10(8): 540.
36. Hashim D, Genden E, Posner M, Hashibe M, Boffetta P. Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Ann Oncol*. 2019; 30(5): 744–756.
37. Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis*. 2019; 10(8): 540.
38. McCarter K, Martínez Ú, Britton B, Baker A, Bonevski B, Carter G et al. Smoking cessation care among patients with head and neck cancer: a systematic review. *BMJ Open*. 2016; 6(9): e012296.
39. Hashim D, Genden E, Posner M, Hashibe M, Boffetta P. Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Ann Oncol*. 2019; 30(5): 744–756.
40. Jordan CJ, Xi Z-X. Discovery and development of varenicline for smoking cessation. *Expert Opin Drug Discov*. 2018; 13(7): 671–683.
41. Bernstein E, Guo N, Goto T, Rothberg MB. Characterizing the variation of alcohol cessation pharmacotherapy in primary care. *J Gen Intern Med*. 2021; 36(7): 1989–1996.
42. Ray LA, Meredith LR, Kiluk BD, Walthers J, Carroll KM, Magill M. Combined pharmacotherapy and cognitive behavioral therapy for adults with alcohol or substance use disorders: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw. Open*. 2020; 3(6): e208279.
43. Kim Y, Hack LM, Ahn ES, Kim J. Practical outpatient pharmacotherapy for alcohol use disorder. *Drugs Context*. 2018; 7: 212308.
44. Reichart PA, Dietrich T, Khongkhunthian P, Srisuwan S. Decline of oropharyngeal cancer in Chiangmai province, Thailand, between 1988 and 1999. *Oral Oncol*. 2003; 39(6): 569-573.
45. Yue P, Han B, Zhao Y. Focus on the molecular mechanisms of cisplatin resistance based on multi-omics approaches. *Mol Omics*. 2023; 19(4): 297-307.

46. Bhattacharjee R, Dey T, Kumar L, Kar S, Sarkar R, Ghorai M et al. Cellular landscaping of cisplatin resistance in cervical cancer. *Biomed Pharmacother.* 2022; 153:113345.
47. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24(17): 2666-2672.
48. Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM et al. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(11): 824-832.
49. Xiang M, Holsinger FC, Colevas AD, Chen MM, Le QT, Beadle BM. Survival of patients with head and neck cancer treated with definitive radiotherapy and concurrent cisplatin or concurrent cetuximab: a surveillance, epidemiology, and end results-medicare analysis. *Cancer.* 2018;124(23): 4486-4494.
50. Gillison ML, Trotti A, Harris J, Eisbruch A, Harari P, Adelstein D et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet.* 2019; 393(10166): 40-50.
51. Bauml JM, Vinnakota R, Park YH, Bates SE, Fojo T, Aggarwal C et al. Cisplatin versus cetuximab with definitive concurrent radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma: an analysis of veterans health affairs data. *Cancer.* 2019; 125(3): 406-415.
52. Pestana R, Becnel M, Rubin M, Torman D, Crespo J, Phan J et al. Response rates and survival to systemic therapy after immune checkpoint inhibitor failure in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2020; 101: 104523.
53. Yin G, Guo W, Duan H, Huang Z. Role of PD-1/PD-L1 inhibitors in the treatment of recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol.* 2021; 46(5): 1013-1020.
54. Chen L, He JN, Zhao SJ, Peng LP, Mo DC, Yin SH. Efficacy and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors combined with standard of care for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2025; 209: 104668.
55. Rui R, Zhou L, He S. Cancer immunotherapies: advances and bottlenecks. *Front Immunol.* 2023; 14: 1212476.
56. Obradovic A, Graves D, Korrer M, Wang Y, Roy S, Naveed A et al. Immunostimulatory cancer-associated fibroblast subpopulations can predict immunotherapy response in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2022; 28(10): 2094-2109.

57. Wang S, Guo S, Guo J, Du Q, Wu C, Wu Y et al. Cell death pathways: molecular mechanisms and therapeutic targets for cancer. *MedComm* (2020). 2024; 5(9): e693.
58. Maueröder C, Gillis CM, Ravichandran KS. Efferocytosis in homeostasis. *Adv Exp Med Biol*. 2025; 1481: 29-69.
59. Kumar S, Calianese D, Birge RB. Efferocytosis of dying cells differentially modulate immunological outcomes in tumor microenvironment. *Immunol Rev*. 2017; 280(1): 149-164.
60. Werfel TA, Cook RS. Efferocytosis in the tumor microenvironment. *Semin Immunopathol*. 2018; 40(6): 545-554.
61. Kourtzelis I, Hajishengallis G, Chavakis T. Phagocytosis of apoptotic cells in resolution of inflammation. *Front Immunol*. 2020; 11: 553.
62. Galluzzi L, Kepp O, Hett E, Kroemer G, Marincola FM. Immunogenic cell death in cancer: concept and therapeutic implications. *J Transl Med*. 2023; 21(1): 162.
63. Silva MT. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett*. 2010; 584(22): 4491-9.
64. Gregory CD. Hijacking homeostasis: regulation of the tumour microenvironment by apoptosis. *Immunol Rev*. 2023; 319(1): 100-127.
65. Ucker DS, Levine JS. Exploitation of apoptotic regulation in cancer. *Front Immunol*. 2018; 9: 241.
66. Bondanza A, Zimmermann VS, Roveri-Querini P, Turnay J, Dumitriu IE, Stach CM et al. Inhibition of phosphatidylserine recognition heightens the immunogenicity of irradiated lymphoma cells in vivo. *J Exp Med*. 2004; 200(9):1157-1165.
67. Chen Y, Chen C-Y, Huang H, Luo Z, Mu Y, Li S, Li S et al. Knocking down of Xkr8 enhances chemotherapy efficacy through modulating tumor immune microenvironment. *J Control Release*. 2024; 370: 479-489
68. ClinicalTrials.gov. A Phase 2 Study of pembrolizumab and bavituximab for progressive recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. Identifier NCT04150900. [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2020 [citado 2025 out 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04150900>.
69. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ*. 2018; 25(3): 486-541.

70. Liu X, Yang W, Guan Z, Yu W, Fan B, Xu N et al. There are only four basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations. *Cell Biosci.* 2018; 8: 6.
71. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26(4): 239-257.
72. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009; 43: 67-93.
73. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015; 34(7): 856-880.
74. Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ.* 2008;15(1): 171-182.
75. An X, Yu W, Liu J, Tang D, Yang L, Chen X. Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death Dis.* 2024; 15(8): 556.
76. Park W, Wei S, Kim BS, Kim B, Bae SJ, Chae YC et al. Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Exp Mol Med.* 2023; 55(8): 1573-1594.
77. Green DR, Llamas F. Cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(12): a006080.
78. Zhang G, Wang J, Zhao Z, Xin T, Fan X, Shen Q et al. Regulated necrosis, a proinflammatory cell death, potentially counteracts pathogenic infections. *Cell Death Dis.* 2022; 13(7): 637.
79. Doran AC, Yurdagul A Jr, Tabas I. Efferocytosis in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20(4): 254-267.
80. Hoepfner DJ, Hengartner MO, Schnabel R. Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2001; 412(6843): 202-6.
81. Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(1): a008748.
82. Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao Y-J, Blumenthal SG, Lindemann RK et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell.* 2003; 113(6): 717-730.

83. Murugesan G, Sandhya Rani MR, Gerber CE, Mukhopadhyay C, Ransohoff RM, Chisolm GM et al. Lysophosphatidylcholine regulates human microvascular endothelial cell expression of chemokines. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35(11): 1375-1384.
84. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER et al. Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature.* 2010; 467(7317): 863-7.
85. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 2009; 461(7261): 282-6.
86. Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ.* 2016; 23(6): 952-961.
87. Borisenko GG, Matsura T, Liu SX, Tyurin VA, Jianfei J, Serinkan FB et al. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells—existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 413(1): 41-52.
88. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001; 276(2): 1071-7.
89. Akakura S, Singh S, Spataro M, Akakura R, Kim J-I, Albert ML et al. The opsonin MFG-E8 is a ligand for the $\alpha\beta 5$ integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res.* 2004; 292(2): 403-416.
90. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell.* 2005; 123(2): 321-334.
91. Schcolnik-Cabrera A, Oldak B, Juárez M, Cruz-Rivera M, Flisser A, Mendlovic F. Calreticulin in phagocytosis and cancer: opposite roles in immune response outcomes. *Apoptosis.* 2019; 24(3-4): 245-255.
92. Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature.* 2002; 418(6894): 200-3.
93. Azuma Y, Nakagawa H, Dote K, Higai K, Matsumoto K. Decreases in CD31 and CD47 levels on the cell surface during etoposide-induced Jurkat cell apoptosis. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34(12): 1828-1834.
94. Logtenberg MEW, Scheeren FA, Schumacher TN. The CD47-SIRP α immune checkpoint. *Immunity.* 2020; 52(5): 742-752.

95. Oldenborg PA, Gresham HD, Lindberg FP. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) regulates Fc γ and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med*. 2001; 193(7): 855-862.
96. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*. 2018; 48(3): 434-452.
97. Khalaji A, Yancheshmeh FB, Farham F, Khorram A, Sheshbolouki S, Zokaei M et al. Don't eat me/eat me signals as a novel strategy in cancer immunotherapy. *Heliyon*. 2023; 9(10): e20507.
98. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016; 23(3): 253-9.
99. Matos P., Skaug J., Marques B., Beck S., Veríssimo F., Gespach C. et al. Small GTPase Rac1: structure, localization, and expression of the human gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 277(3): 741-751.
100. De P, Aske JC, Dey N. RAC1 Takes the lead in solid tumors. *Cells*. 2019; 8(5): 382.
101. Zhou X, Herbst-Robinson KJ, Zhang J. Visualizing dynamic activities of signaling enzymes using genetically encodable FRET-based biosensors: from designs to applications. *Methods Enzymol*. 2012; 504: 317-340.
102. Kaynak A, Davis HW, Kogan AB, Lee J-H, Narmoneva DA, Qi X. Phosphatidylserine: The unique dual-role biomarker for cancer imaging and therapy. *Cancers (Basel)*. 2022;14(10): 2536.
103. Birge RB, Boeltz S, Kumar S, Carlson J, Wanderley J, Calianese D et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ*. 2016; 23(6): 962-978.
104. Gadiyar V, Davra V, Pulica R, Frederick T, Varsanyi C, Aquib A et al. Phosphatidylserine (PS)-targeting chimeric interferon (IFN) fusion proteins for anti-tumor applications. *bioRxiv [Preprint]*. 2025; 634764.
105. Hsiehchen D, Beg MS, Kainthla R, Lohrey J, Kazmi SM, Khosama L et al. The phosphatidylserine-targeting antibody bavituximab plus pembrolizumab in unresectable hepatocellular carcinoma: A phase 2 trial. *Nat Commun*. 2024; 15(1): 2178.
106. Ran S, Thorpe PE. Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002; 54(5): 1479-1484.
107. Belzile O, Huang X, Gong J, Carlson J, Schroit AJ, Brekken RA et al. Antibody targeting of phosphatidylserine for the detection and immunotherapy of cancer. *Immunotargets Ther*. 2018; 7: 1-14.

108. Dayoub AS, Brekken RA. TIMs, TAMs, and PS-antibody targeting: implications for cancer immunotherapy. *Cell Commun Signal*. 2020; 18(1): 29.
109. Gerber DE, Hao G, Watkins L, Stafford JH, Anderson J, Holbein B et al. Tumor-specific targeting by Bavituximab, a phosphatidylserine-targeting monoclonal antibody with vascular targeting and immune modulating properties, in lung cancer xenografts. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2015; 5(5): 493-503.
110. Beck AW, Luster TA, Miller AF, Holloway SE, Conner CR, Barnett CC et al. Combination of a monoclonal anti-phosphatidylserine antibody with gemcitabine strongly inhibits the growth and metastasis of orthotopic pancreatic tumors in mice. *Int J Cancer*. 2006; 118(10): 2639-2643.
111. He J, Yin Y, Luster TA, Watkins L, Thorpe PE. Antiphosphatidylserine antibody combined with irradiation damages tumour blood vessels and induces tumour immunity in a rat model of glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(22): 6871-6880.
112. Ly KI, Richardson LG, Liu M, Muzikansky, Cardona J, Lou K et al. Bavituximab Decreases Immunosuppressive Myeloid-Derived Suppressor Cells in Newly Diagnosed Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res*. 2023; 29(16): 3017-3025.
113. Yin Y, Huang X, Lynn KD, Thorpe PE. Phosphatidylserine-targeting antibody induces M1 macrophage polarization and promotes myeloid-derived suppressor cell differentiation. *Cancer Immunol Res*. 2013; 1(4): 256-268.
114. Korn D, Frasch SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol*. 2011; 2: 57.
115. Sarode GS. Efferocytosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2016; 20(2): 170-2.
116. Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2015; 36: 103-112.
117. Kazanietz MG, Caloca MJ. The Rac GTPase in cancer: from old concepts to new paradigms. *Cancer Res*. 2017; 77(20): 5445-5451.
118. Bid HK, Roberts RD, Manchanda PK, Houghton PJ. RAC1: an emerging therapeutic option for targeting cancer angiogenesis and metastasis. *Mol Cancer Ther*. 2013; 12(10): 1925–1934.
119. Marei H, Malliri A. Rac1 in human diseases: the therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms. *Small GTPases*. 2017; 8(3): 139-163.

120. Elliott MR, Ravichandran KS. The dynamics of apoptotic cell clearance. *Dev. Cell.* 2016; 38(2): 147-160.
121. Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(3): 166-180.
122. Arandjelovic, S., & Ravichandran, K. S. (2015). Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nature Immunology*, 16, 907-917.
123. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer.* 2014; 14(11): 754-762.
124. Chalasani P, Marron M, Roe D, Clarke K, Iannone M, Livingston RB et al. A phase I trial of bavituximab and paclitaxel in patients with HER2 negative metastatic breast cancer. *Cancer Med.* 2015; 4(7): 1051–9.
125. Bosco EEF, Mulloy JC, Zheng Y. Rac1 GTPase: a “Rac” of all trades. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(3): 370-4.
126. Chen KVM, Groot AE, Mendez SA, Mallin MM, Amend SR, Pienta KJ. Targeting MerTK decreases efferocytosis and increases anti-tumor immune infiltrate in prostate cancer. *Med Oncol.* 2023; 40(10): 284.
127. Zhou Y, Yao Y, Deng Y, Shao A. Regulation of efferocytosis as a novel cancer therapy. *Cell Commun Signal.* 2020; 18(1): 71.
128. Zhu G, Wan X, Wu W, Jia L, Yu X, Mo H et al. Targeting frequent efferocytosis in tumor microenvironment is a new direction for cancer treatment. **Small Sci.** 2025; 5(4): 2400479.
129. DeRose P, Thorpe PE, Gerber DE. Development of bavituximab, a vascular targeting agent with immune-modulating properties, for lung cancer treatment. *Immunotherapy.* 2011; 3(8): 933-944.
130. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT et al. Tumor exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015; 527(7578): 329-335.
131. Spindler V, Schlegel N, Waschke J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc Res.* 2010; 87(2): 243-253.
132. Bitar GG, Persad M, Dragan A, Alade A, Jiménez-Labaig P, Johnston E et al. Ultrasound-guided intra-tumoral administration of directly-injected therapies: a review of the technical and logistical considerations. *Cancer Imaging.* 2024; 24(1): 145.

133. Hamid O, Ismail R, Puzanov I. Intratumoral immunotherapy—update 2019. *Oncologist*. 2020; 25(3): e423-e438.
134. Nakaya M, Kitano M, Matsuda M, Nagata S. Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(27): 9198–9203.
135. Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology*. 2012; 7: 61-98.
136. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017; 14(7): 399-416.
137. Costa NL, Valadares MC, Souza PPC, Mendonça EF, Oliveira JC, Silva TA et al. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2013; 49(3): 216–223.
138. Petruzzi MNMR, Cherubini K, Salum FG, Figueiredo MAZ. Role of tumour-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma. *Diagn Pathol*. 2017; 12(1): 32.
139. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6): 394-424.
140. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5) :269-282.
141. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018; 24(5): 541-550.
142. Cassetta L, Pollard JW. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2018; 17(12): 887-904.
143. Katoh M, Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5(9): 1059-1064.
144. Seki H, Hayashida T, Jinno H, Hirose S, Sakata M, Takahashi M et al. HOXB9 expression promoting tumor cell proliferation and angiogenesis is associated with clinical outcomes in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19(6): 1831-1840.
145. Cao Z, Leng P, Xu H, Li X. The regulating role of galectin-9 in immune cell populations. *Front Pharmacol*. 2024; 15: 1462061.

- 146.** Spranger S, Gajewski TF. Tumor-intrinsic oncogene pathways mediating immune avoidance. *Oncoimmunology*. 2016; 5(3): e1086862.
- 147.** Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. The immune landscape of cancer. *Immunity*. 2018; 48(4): 812-830.e14.