



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA E**  
**FARMACOLOGIA**

**BEATRIZ GONÇALVES SILVA ROCHA**

**PAPEL DOS NERVOS SENSORIAIS NA PROGRESSÃO DO TUMOR DE MAMA**  
**MURINO E0771**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2022**

**BEATRIZ GONÇALVES SILVA ROCHA**

**PAPEL DOS NERVOS SENSORIAIS NA PROGRESSÃO DO TUMOR DE MAMA  
MURINO E0771**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas

- Área de Concentração: Fisiologia

**Orientador:** Prof. Dr. Alexander Birbrair

**Co- orientadora:** Prof. Dr. Leda Maria de Castro  
Coimbra Campos

**BELO HORIZONTE – MG**

**2022**

043

Rocha, Beatriz Gonçalves Silva.

Papel dos nervos sensoriais na progressão do tumor de mama murino  
E0771 [manuscrito] / Beatriz Gonçalves Silva Rocha. – 2022.  
82 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Birbrair. Co-orientadora: Prof. Dr. Leda Maria de Castro Coimbra Campos.

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

1. Fisiologia. 2. Neoplasias da Mama. 3. Microambiente Tumoral. 4. Sistema Nervoso Periférico. 5. Células Receptoras Sensoriais. I. Birbrair, Alexander. II. Campos, Leda Maria de Castro Coimbra. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 558 DE BEATRIZ GONÇALVES SILVA ROCHA**

Às 14:00 horas do dia 17 do mês de junho de 2022, transmitida pela plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Beatriz Gonçalves Silva Rocha**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Alexander Birbrair**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Remo de Castro Russo**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Luiz Alexandre Viana Magno**, UNIFENAS-BH, **Profa. Dra. Leda Maria de Castro Coimbra Campos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, coorientadora, e **Prof. Dr. Alexander Birbrair**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Papel dos Nervos Sensoriais Na Progressão do Tumor de Mama Murino E0771**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 17 de junho de 2022.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo, Professor do Magistério Superior**, em 20/06/2022, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexander Birbrair, Professor do Magistério Superior**, em 21/06/2022, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Alexandre Viana Magno, Usuário Externo**, em 21/06/2022, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leda Maria de Castro Coimbra Campos, Usuário Externo**, em 22/06/2022, às 09:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site  
[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?)



[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](#), informando o código verificador **1521316** e o código CRC **5CFB46C6**.

---

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cecília e Paulo, por me ensinarem tudo o que sei sobre o amor, por serem a base da nossa família e por todos os sacrifícios que fizeram para que eu estivesse aqui, concluindo mais essa etapa. Sem vocês nada disso seria possível!

Aos meus irmãos, Lucas e Gabriela, por todo amor, apoio e compreensão. Obrigada pelos momentos que dividimos até aqui e por todos os outros que ainda virão. Ter vocês em minha vida é um presente, seremos sempre nós três.

Ao meu futuro marido, Junior, por ser meu porto-seguro todos os dias, sempre com uma palavra de amor e incentivo. Estou pronta pra enfrentar todos os próximos desafios ao seu lado, por uma vida toda.

A minha família (incluindo a nova), tios e tias, primos e primas, obrigada por dividirem essa alegria.

Aos meus falecidos avós, sei que, onde quer que estejam, estão felizes com essa conquista.

Aos amigos que fiz no BirbrairLab, por todos os momentos de trabalho, alegria e aprendizado que dividimos. Agradeço especialmente a Caroline, Bryan, Gabryella e Alinne, por esse quinteto que formamos para ajudar a aliviar as dificuldades, fora e dentro do laboratório.

A minha coorientadora, Leda, por todas as direcionamentos e também por me receber com tanto carinho, desde a minha chegada em Belo Horizonte.

Ao meu orientador, Alexander Birbrair, que me deu essa oportunidade e todos os meios para tornar essa pesquisa possível. Obrigada por acreditar no meu potencial desde o princípio e por ser um grande incentivador da minha carreira.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Departamento de Patologia, pelas aulas, ensinamentos e direcionamentos para a realização desse trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Instituto Serrapilheira, pelo apoio financeiro.

**Obrigada a todos.**

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para  
temer menos."

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more,  
so that we may fear less."

**Marie Curie**

## RESUMO

O câncer de mama é o mais comumente diagnosticado e o mais letal entre as mulheres do mundo todo. No Brasil é a principal causa de morte por câncer nessa população. Compreender o microambiente tumoral e as interações celulares que ali ocorrem é fundamental para a identificação de novas terapias para tratar o câncer de mama. Dentre os componentes desse tumor, a inervação sensorial ainda não teve a sua função estabelecida na progressão da doença. Em nosso estudo, detectamos a presença dos neurônios sensoriais no tumor mamário de um modelo murino inoculado com células E0771 e avaliamos o impacto da depleção química dessa inervação no desenvolvimento tumoral. Observamos que a ausência dos nervos sensoriais foi capaz de inibir o crescimento do tumor, alterando também a vasculatura, proliferação celular e a expressão de caderinas intratumorais. Além disso, tumores denervados apresentaram uma redução das metástases pulmonares espontâneas nesse modelo. Nossos dados sugerem uma interação negativa dos neurônios sensoriais com o microambiente tumoral, propiciando a progressão da doença. Portanto, descobrir novas maneiras para bloquear a inervação sensorial em pacientes com câncer de mama pode ser uma alternativa promissora para terapia antitumoral.

**Palavras-chave:** Câncer de Mama. Microambiente Tumoral. Desenvolvimento Tumoral. Sistema Nervoso Periférico. Neurônios Sensoriais.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most commonly diagnosed and most lethal cancer among women worldwide. In Brazil it is the leading cause of cancer death in this population. Understanding the tumor microenvironment and the cellular interactions that occur in it is fundamental for the identification of new therapies to treat breast cancer. Among the components of this tumor, sensory innervation has not yet had its role established for the progression of the disease. In our study, we detected the presence of sensory neurons in the mammary tumor of a murine model inoculated with E0771 cells and we evaluated the impact of chemical depletion of this innervation in tumor development. We observed that the absence of sensory nerves was able to inhibit tumor growth, also altering vasculature, cell proliferation and the expression of intratumoral cadherins. Also, denervated tumors showed a decrease of spontaneous lung metastases in this model. Thus, our data suggest a negative interaction of sensory neurons with the tumor microenvironment favoring the disease progression. Therefore, finding new ways to block sensory innervation in breast cancer patients could be a promising alternative for antitumor therapy.

**Keywords:** Breast Cancer. Tumor Microenvironment. Tumor Development. Peripheral Nervous System. Sensory Neurons.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Número estimado de novos casos, em 2020, em relação aos principais cânceres por país em mulheres de todas as idades. ....   | 16 |
| Figura 2. Classificação histológica e molecular dos cânceres de mama. ....  | 18 |
| Figura 3. Heterogeneidade celular no microambiente tumoral do câncer de mama reflete na resposta terapêutica entre pacientes diagnosticados com o mesmo subtipo histológico. .... | 19 |
| Figura 4. Cascata metastática do câncer de mama. ....   | 21 |
| Figura 5. Identificação das glândulas mamárias de camundongos. ....   | 27 |
| Figura 6. Características do câncer. ....   | 30 |
| Figura 7. Microambiente do tumor mamário. ....  | 33 |
| Figura 8. Inervação sensorial no microambiente tumoral. ....  | 34 |
| Figura 9. Os neurônios sensoriais Nav1.8+ estão presentes no microambiente tumoral da mama. ....  | 46 |
| Figura 10. A depleção química dos neurônios sensoriais inibe o desenvolvimento tumoral. ....  | 49 |
| Figura 11. A depleção química dos neurônios sensoriais altera a angiogênese, proliferação celular e a expressão de glicoproteínas de membrana. ....                               | 52 |
| Figura 12. A ausência de inervação sensorial não interfere no surgimento de metástases espontâneas hepáticas, cerebrais e femorais. ....  | 55 |
| Figura 13. A ausência de inervação reduz as metástases espontâneas pulmonares. ....   | 58 |
| Figura 14. Ilustração esquemática resumindo os resultados da denervação sensorial no microambiente tumoral da mama. ....  | 65 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|       |   |
|-------|---|
| BRCA1 | <i>Breast Cancer Gene 1</i> / Gene 1 do Câncer de Mama  |
| BRCA2 | <i>Breast Cancer Gene 2</i> / Gene 2 do Câncer de Mama  |
| CAMs  | <i>Cell Adhesion Molecules</i> / Moléculas de Adesão Celular  |
| CAPI  | Centro de Aquisição e Processamento de Imagens  |
| CD    | Células Dendríticas   |
| CEUA  | Comissão de Ética no Uso de Animais   |
| CGRP  | <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i> / Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina                        |
| DMEM  | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>   |
| DRG   | <i>Dorsal Root Ganglion</i> / Gânglio Da Raiz Dorsal  |
| FACs  | Fibroblastos Associados ao Câncer   |
| HER2  | <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-Type 2</i> / Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 |
| IARC  | <i>International Agency for Research on Cancer</i> / Agência Internacional de Pesquisa em Câncer            |
| ICB   | Instituto de Ciências Biológicas  |
| INCA  | Instituto Nacional de Câncer  |
| MEC   | Matriz Extracelular   |
| MMPs  | Metaloproteinases da Matriz   |
| NF200 | Neurofilamento 200  |
| NGF   | <i>Nerve Growth Factor</i> / Fator De Crescimento Neural  |
| NK    | <i>Natural Killer</i>   |

|        |  |
|--------|--|
| NKLAM  | <i>Molecule Natural Killer Lytic-Associated/ Molécula Natural Killer Associada a</i> |
| Lítico |  |
| OCT    | <i>Optimal Cutting Temperature/ Temperatura Ótima de Corte</i>                       |
| PBS    | <i>Phosphate Buffered Saline/ Tampão fosfato-salino</i>                              |
| PD-1   | <i>Programmed Cell Death Protein 1/ Proteína de Morte Programada 1</i>               |
| PDL-1  | <i>Programmed Cell Death Ligand 1/ Ligante de Morte Programada 1</i>                 |
| PGP9.5 | <i>Protein Gene Product 9.5/ Produto Proteico do Gene 9.5</i>                        |
| PTEN   | <i>Phosphatase and tensin homolog/ Homólogo de Fosfatase e Tensina</i>               |
| RE     | Receptor de Estrogênio   |
| RP     | Receptor de Progesterona   |
| RTX    | Resiniferotoxina   |
| SNC    | Sistema Nervoso Central  |
| SNP    | Sistema Nervoso Periférico   |
| TEB    | <i>Terminal End Buds/ Brotos Terminais</i>   |
| TEM    | Transição Epitélio-mesenquimal   |
| TNBC   | <i>Triple-negative Breast Cancer/ Câncer de Mama Triplo Negativo</i>                 |
| TP53   | <i>Tumor Protein 53/ Proteína Tumoral 53</i>   |
| UFMG   | Universidade Federal de Minas Gerais   |
| USP    | Universidade de São Paulo  |
| VEGF   | <i>Vascular Endothelial Growth Factor/ Fator de Crescimento Endotelial Vascular</i>  |
| VGSC   | <i>Voltage-Gated Sodium Channels/ Canais de Sódio Dependentes de Voltagem</i>        |
| WT     | <i>Wild Type</i>   |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 14 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....  | 16 |
| <input type="checkbox"/> Câncer de mama .....  | 16 |
| <input type="checkbox"/> Metástase no câncer de mama .....   | 20 |
| <input type="checkbox"/> Linhagem celular E0771.....   | 24 |
| <input type="checkbox"/> Parênquima mamário de camundongos.....  | 26 |
| <input type="checkbox"/> Microambiente tumoral .....   | 29 |
| <input type="checkbox"/> Inervação sensorial e câncer .....  | 34 |
| 3. JUSTIFICATIVA.....  | 39 |
| 4. OBJETIVOS.....  | 40 |
| <input type="checkbox"/> Objetivo Geral .....  | 40 |
| <input type="checkbox"/> Objetivos Específicos .....   | 40 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 41 |
| <input type="checkbox"/> Animais.....  | 41 |
| <input type="checkbox"/> Manutenção dos animais .....  | 41 |
| <input type="checkbox"/> Fenotipagem para Nav 1.8-Cre/TdTomato.....  | 41 |
| <input type="checkbox"/> Linhagem celular e cultura .....  | 42 |
| <input type="checkbox"/> Análise do crescimento tumoral in vivo .....  | 42 |
| <input type="checkbox"/> Depleção química dos nervos sensoriais .....  | 42 |
| <input type="checkbox"/> Microscopia de Imunofluorescência.....  | 43 |
| <input type="checkbox"/> Análise estatística .....   | 43 |
| 6. RESULTADOS.....   | 44 |
| <input type="checkbox"/> Os neurônios sensoriais Nav1.8 <sup>+</sup> estão presentes no microambiente tumoral da mama ....                                       | 44 |
| <input type="checkbox"/> A depleção química dos neurônios sensoriais inibe o desenvolvimento tumoral .....   | 47 |
| <input type="checkbox"/> A depleção química dos neurônios sensoriais altera a angiogênese, proliferação celular e a expressão de glicoproteínas de membrana..... | 50 |
| <input type="checkbox"/> A ausência de inervação sensorial não interfere no surgimento de metástases espontâneas hepáticas, cerebrais e femorais .....           | 53 |
| <input type="checkbox"/> A ausência de inervação reduz as metástases espontâneas pulmonares .....  | 56 |

|  |    |
|--|----|
| 7. DISCUSSÃO.....  | 59 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                     | 65 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                               | 66 |
| 10. APÊNDICE .....   | 80 |
| □ Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG ..... | 80 |

## 1. INTRODUÇÃO

Em toda a população feminina mundial, o câncer de mama é o mais comum e o mais letal (SANCHO-GARNIER; COLONNA, 2019). Atualmente, o câncer de mama feminino é o tipo de câncer mais comumente diagnosticado no mundo (IARC, 2020). Apenas no ano de 2020, cerca de 2,3 milhões de mulheres receberam o diagnóstico e 685 mil mortes ocorreram em decorrência da doença, sendo assim essa a causa mais comum de morte por câncer em mulheres e a quinta causa mais comum de mortes por câncer no geral (IARC, 2020).

No Brasil, o câncer de mama é a principal causa de morte por câncer na população feminina de todas as regiões do país, exceto na região Norte, onde essa posição é ocupada pelo câncer de colo do útero (INCA, 2020). Para o ano de 2021, foram estimados 66.280 novos casos da doença (INCA, 2020).

O microambiente tumoral da mama é complexo, incluindo diversos tipos celulares, como os fibroblastos, pericitos, adipócitos, células endoteliais entre outras. Novos estudos têm demonstrado que o sistema nervoso também está presente no desenvolvimento do câncer, incluindo o de mama (AYALA; DAI; POWELL; LI *et al.*, 2008; MARCHESI; PIEMONTI; MANTOVANI; ALLAVENA, 2010; PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015; SEIFERT; BENEDIC; EFFERT, 2002). No entanto, os papéis desempenhados pela inervação sensorial no desenvolvimento tumoral ainda não foram estabelecidos.

Os neurônios sensoriais possuem vários canais de sódio dependentes de voltagem (VGSC) que estão associados a respostas térmicas, mecânicas e químicas (DJOUHRI; FANG; OKUSE; WOOD *et al.*, 2003; FELTS; YOKOYAMA; DIB-HAJJ; BLACK *et al.*, 1997; ISOM, 2001; MIAO; GAO; WU; LU *et al.*, 2010). O Nav1.8 é um subconjunto do VGSC que consiste em poros com duas subunidades  $\alpha$  que ajudam a excitabilidade dos neurônios sensoriais (DJOUHRI; FANG; OKUSE; WOOD *et al.*, 2003; STIRLING; FORLANI; BAKER; WOOD *et al.*, 2005). O Nav1.8 também é considerado um nociceptor presente no gânglio da raiz dorsal (DRG) e em cerca de dois terços dos corpos sensitivos aferentes do gânglio nodal (DJOUHRI; FANG; OKUSE; WOOD *et al.*, 2003; GAUTRON; SAKATA; UDIT; ZIGMAN *et al.*, 2011; STIRLING; FORLANI; BAKER; WOOD *et al.*, 2005). Este VGSC pode ser mais encontrado no 1º e 2º nível espinhal sacral (S1 e

S2), quase 72%, e em menor quantidade no 4º, 5º e 6º nível espinal lombar (L4, L5 e L6), quase 61% (MINETT; EIJKELKAMP; WOOD, 2014). Além disso, o Nav1.8 está associado a nervos periféricos que estão exclusivamente em neurônios sensoriais, mas não no Sistema Nervoso Central (SNC) (AKOPIAN; SIVILOTTI; WOOD, 1996; MIAO; GAO; WU; LU *et al.*, 2010).

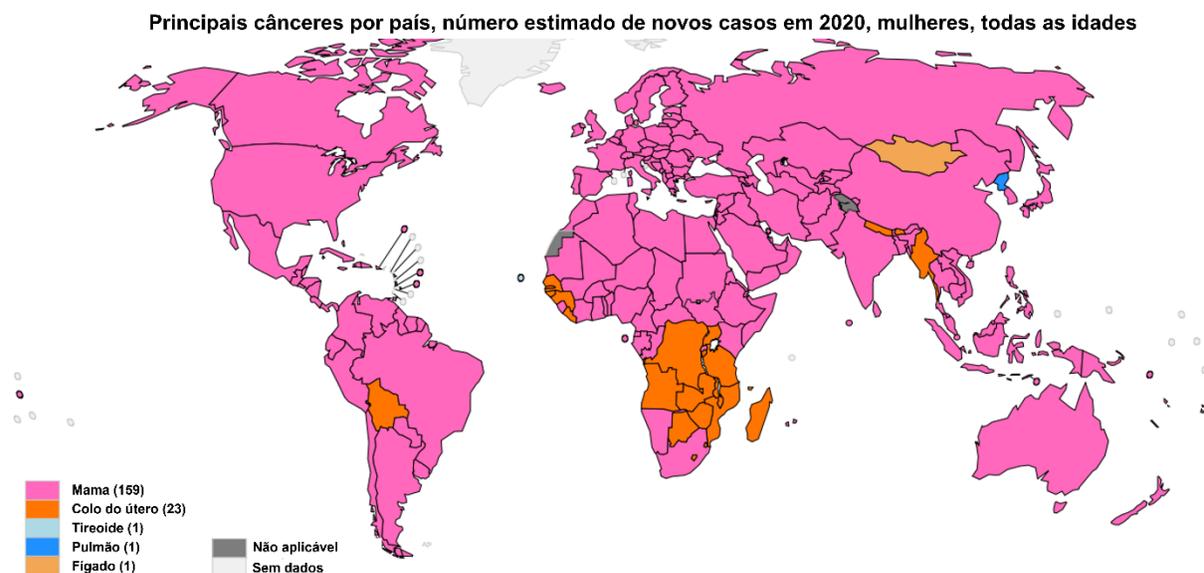
A mama é um órgão densamente inervado por fibras sensitivas, principalmente na pele e região dos mamilos, e fibras simpáticas, nos vasos sanguíneos e ductos (MIAO; GAO; WU; LU *et al.*, 2010; PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015; SARHADI; SHAW DUNN; LEE; SOUTAR, 1996; ZHAO; YANG; LIANG; DU *et al.*, 2014). Estudos anteriores demonstraram que a presença de fibras nervosas sensoriais está relacionada a um pior prognóstico de câncer de mama e potencial metastático com maior taxa de invasão de linfonodos (PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015). Estudos em modelos *in vivo* mostraram que os tumores de mama têm maior expressão de PGP9.5 (Produto Proteico do Gene 9.5) e CGRP (Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina), ambos marcadores muito expressos nas fibras positivas de Nav 1.8 (AUSTIN; ELLIOTT; NICOLAOU; GRABOWSKA *et al.*, 2017; GAUTRON; SAKATA; UDIT; ZIGMAN *et al.*, 2011). Esse número aumentado de fibras nervosas também pode estar relacionado a uma alta taxa de densidade de microvasos, bem como a uma alta expressão do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF-A), fator importante para angiogênese tumoral, que pode ser expresso em terminais nervosos sensoriais (AUSTIN; ELLIOTT; NICOLAOU; GRABOWSKA *et al.*, 2017; ZHAO; YANG; LIANG; DU *et al.*, 2014). Diante disso, torna-se necessário pesquisas para avaliar os nervos sensoriais no desenvolvimento tumoral da mama, e sua interação com esse microambiente.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

- *Câncer de mama*

Estimativas globais da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) demonstraram recentemente que o câncer de mama feminino se tornou o tipo de câncer mais comumente diagnosticado no mundo (IARC, 2020).

Para o ano de 2020, cerca de 2,3 milhões de mulheres receberam o diagnóstico e 685 mil mortes ocorreram em decorrência da doença, sendo assim essa a causa mais comum de morte por câncer em mulheres e a quinta causa mais comum de mortes por câncer no geral (IARC, 2020).

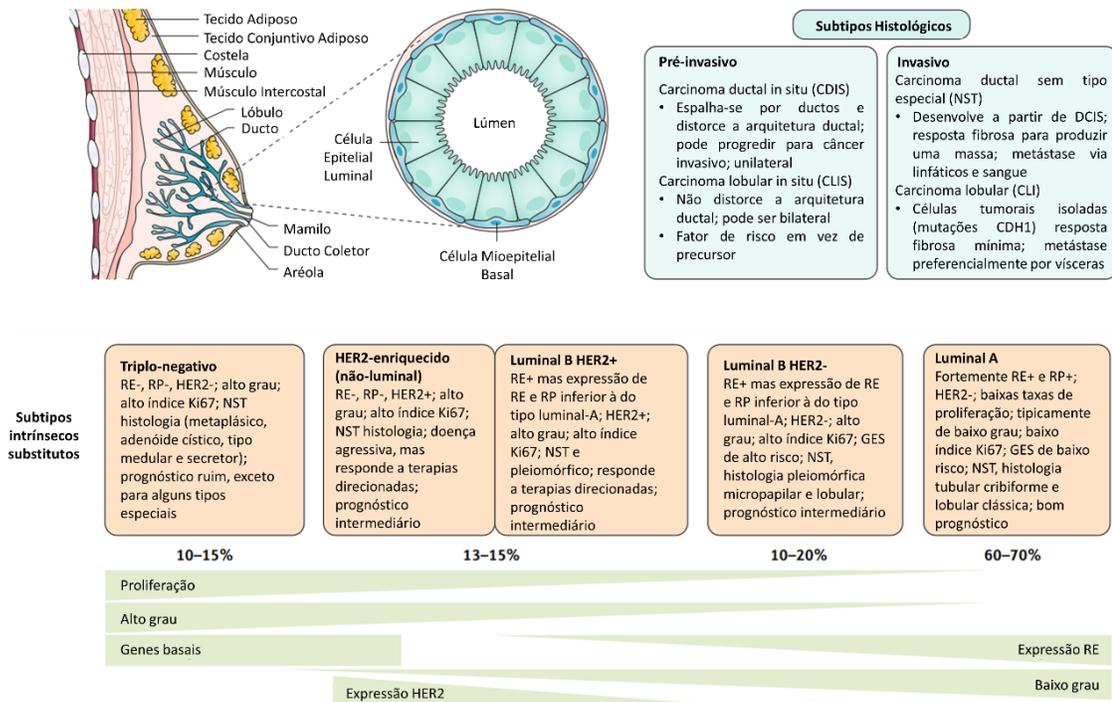


**Figura 1.** Número estimado de novos casos, em 2020, em relação aos principais cânceres por país em mulheres de todas as idades. Imagem adaptada, retirada do observatório global do câncer realizado pela IARC, mostrando que no Brasil, assim como na maioria dos países, o câncer de mama é o mais incidente. Fonte: Produção gráfica: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>). Organização Mundial da Saúde. Data de acesso: 11/05/2022.

A origem e progressão do câncer de mama, processo conhecido como carcinogênese, ocorre a partir das células epiteliais do órgão, é um processo heterogêneo e que pode ser subclassificado levando em consideração diferentes abordagens, como a histologia, patologia molecular, genética e análise da expressão gênica (SIMS; HOWELL; HOWELL; CLARKE, 2007).

As classificações servem para determinar informações prognósticas, ou seja, sobre o comportamento do tumor ou em relação à resposta terapêutica. Considerando as características histológicas, o câncer de mama pode ser classificado como I) carcinoma ductal e II) lobular, ambas lesões invasivas, caracterizadas por alta heterogeneidade celular, baixa taxa de sobrevida e probabilidade aumentada de desenvolvimento de metástases (BOMBONATI; SGROI, 2011; HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT *et al.*, 2019). Suas respectivas lesões pré-invasivas, o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma lobular *in situ*, apresentam uma proliferação epitelial atípica, mas uma membrana basal intacta, impedindo a invasão das células tumorais aos tecidos adjacentes (HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT *et al.*, 2019).

A presença ou ausência de receptores presentes na membrana celular, são informações utilizadas na prática clínica e que auxiliam na classificação histológica-molecular dos tumores de mama, sendo estes: I) receptores de estrógeno (RE), II) receptores de progesterona (RP) e III) fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2), como esquematizado na Figura 2. Portanto, baseado na expressão desses receptores, o câncer de mama pode ser subdividido em: I) Triplo Negativo, II) HER2<sup>+</sup>, III) Luminal B/HER2<sup>+</sup>, IV) Luminal B/ Her2<sup>-</sup> e V) Luminal A (HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT *et al.*, 2019).



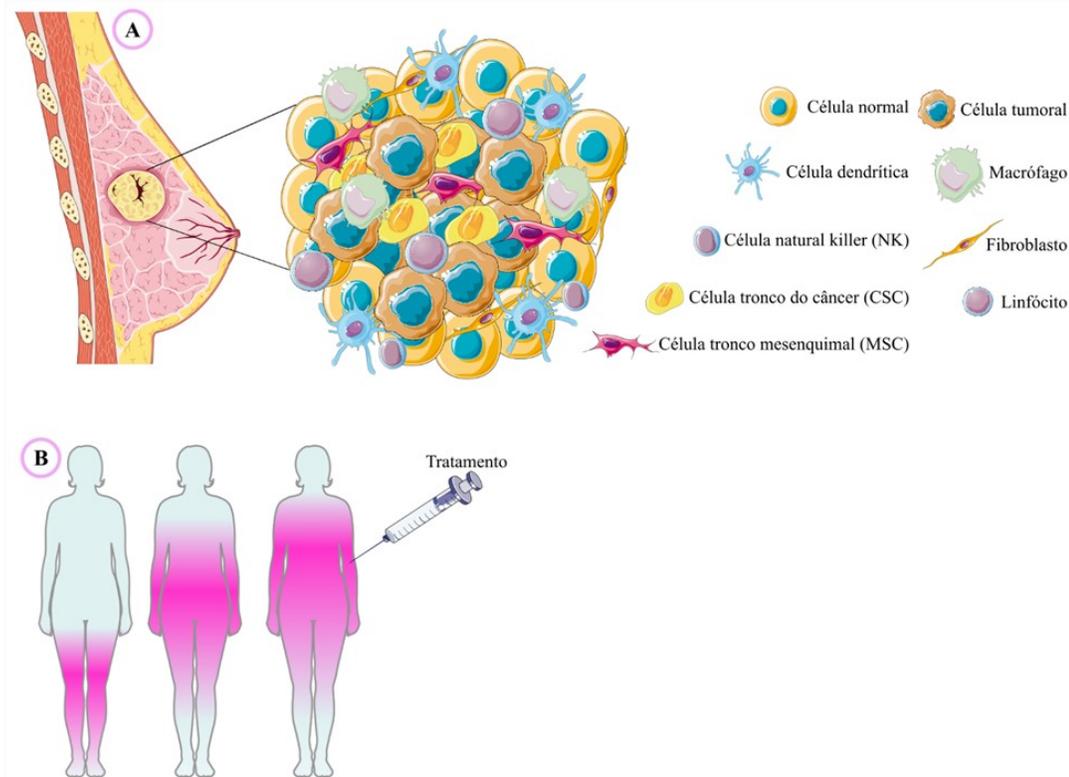
**Figura 2. Classificação histológica e molecular dos cânceres de mama.** Os cânceres de mama surgem nas unidades lobulares do ducto terminal, a unidade funcional da mama, nomeados acima (canto superior esquerdo). Classificação histológica (canto superior direito) e os subtipos intrínsecos substitutos (parte inferior), baseados na histologia e expressão imuno-histoquímica de proteínas-chave: RE, RP, HER2 e o marcador de proliferação Ki67. Fonte: (HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT et al., 2019) Adaptada.

Dentre os tipos de câncer de mama, destaca-se o subtipo triplo-negativo (TNBC), que é definido como sendo negativo para RE, RP e HER2. Atualmente muito se discute a respeito desse subtipo histológico, que possui o comportamento clínico mais agressivo e é encontrado em aproximadamente 11% dos carcinomas invasivos (THIKE; CHEOK; JARA-LAZARO; TAN *et al.*, 2010).

TNBCs representam cerca de 15% dos casos totais de CM e detêm taxas de mortalidade cada vez mais crescentes, isto se deve ao seu perfil extremamente agressivo, o que reflete na taxa de sobrevida dos pacientes. Em alguns casos, com o tratamento adequado, há uma redução de até 38% no risco de morte, representando um ganho de aproximadamente, 10 meses em termos de sobrevida, com isso, destaca-se a relevância dos avanços na identificação de marcadores

moleculares para o prognóstico e manejo terapêutico da disfunção patológica que representa os TNBCs (FERREIRA; BRIANESE; DE ALMEIDA; DRUMMOND *et al.*, 2019).

TNBCs possuem uma natureza extremamente heterogênea. O microambiente tumoral é um dos fatores que amplificam a heterogeneidade intratumoral por apenas exercer diferentes tipos de pressão seletiva nas células do tumor. Fatores intrínsecos e extrínsecos contribuem para o aumento da instabilidade genômica tumoral que é a principal característica do câncer de mama. Esses modelos não são respectivamente exclusivos, e atuam em conjunto para criar um complexo sistema com múltiplas camadas de heterogeneidade estabelecidas pelas diversas características genéticas, epigenéticas, transcriptômicas, proteômicas e traços funcionais de diferentes subtipos celulares. Além da heterogeneidade intratumoral, existe a heterogeneidade intertumoral, caracterizada pelas diferenças fenotípicas e moleculares entre tumores de diferentes pacientes que apresentem o mesmo subtipo histológico da doença (LAWSON; KESSENBROCK; DAVIS; PERVOLARAKIS *et al.*, 2018).



**Figura 3. Heterogeneidade celular no microambiente tumoral do câncer de mama reflete na resposta terapêutica entre pacientes diagnosticados com o mesmo subtipo histológico. Esta**

figura ilustra a composição do microambiente tumoral (1) que agrega diferentes tipos celulares, desde células do sistema imune até as células normais da mama, as tumorais, as células tronco do câncer (CSCs) e células tronco mesenquimais. Esta heterogeneidade reflete na resposta à terapia em pacientes portadores do mesmo subtipo de câncer (2).

A dificuldade de diagnóstico prévio implica na alta taxa de mortalidade dos pacientes, juntamente com a falta de tratamentos eficazes. Além disso, a maioria dos métodos de tratamentos não se baseia na terapia personalizada, que é um fator crucial, pois considera tanto a heterogeneidade intratumoral (dentro do tumor) quanto a intertumoral (entre pacientes diagnosticados com o mesmo subtipo histológico). A falta dessa individualização acaba sendo um dos maiores problemas enfrentados atualmente na luta contra o TNBC (HANAHAN; COUSSENS, 2012; WANG; ZHAO; ZHANG; WEI *et al.*, 2017).

Com os avanços tecnológicos na área da saúde, atualmente, tornaram-se possíveis as avaliações de prognósticos por meio de análises moleculares das neoplasias, estas de extrema importância para o tratamento individualizado e escolha de terapia sistêmica que seja mais apropriada para cada paciente, levando enfoque nos fatores relacionados a um caráter de risco aumentado ou diminuído de recidiva após o tratamento (HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT *et al.*, 2019; WINTERS; MARTIN; MURPHY; SHOKAR, 2017).

Fatores genéticos, hormonais, ambientais e comportamentais aumentam o risco do desenvolvimento do câncer de mama. Menarca precoce, falta de aleitamento materno, menopausa tardia, gravidez em idade avançada, uso de álcool e falta de exercício físico são alguns fatores que aumentam o risco de desenvolvimento da doença (DANAIEI; VANDER HOORN; LOPEZ; MURRAY *et al.*, 2005; HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT *et al.*, 2019). Mutações em genes como os que codificam as proteínas TP53 (Proteína Tumoral 53), BRCA1 (Gene 1 do Câncer de Mama), BRCA2 (Gene 2 do Câncer de Mama) e PTEN (Homólogo de Fosfatase e Tensina) também influenciam a predisposição para o desenvolvimento do câncer de mama (SHIOVITZ; KORDE, 2015).

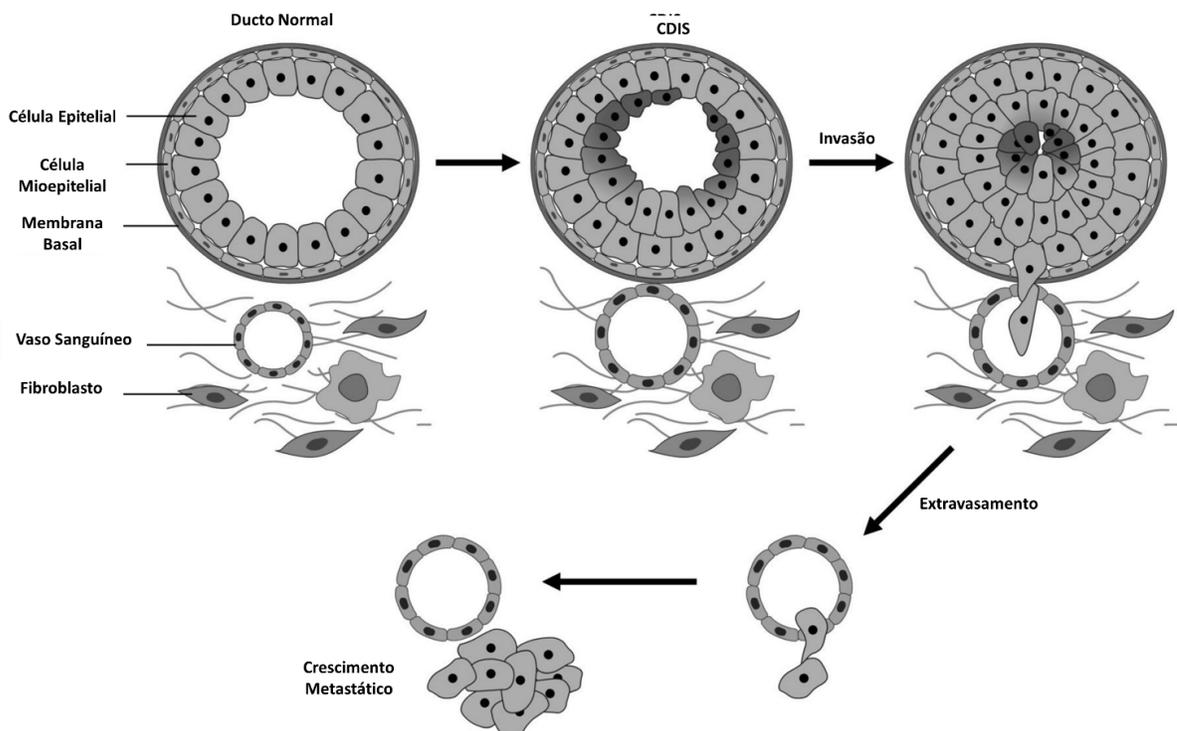
- ***Metástase no câncer de mama***

Aproximadamente 10 a 15% das pacientes com câncer de mama desenvolvem uma forma agressiva da doença, com a presença de metástases em órgãos distantes dentro de até 3 anos após

o diagnóstico inicial. Entretanto, não é incomum, que manifestações metastáticas também ocorram em tecidos distantes, 10 anos ou mais após a detecção do tumor primário (WEIGELT; PETERSE; VAN 'T VEER, 2005).

Após a disseminação, as células de câncer de mama são capazes de desenvolver lesões metastáticas em diversos tecidos e órgãos. Para esse tipo de câncer, os locais de maior ocorrência de metástases são os ossos, cérebro, pulmões e fígado (LEE, 1983).

O desenvolvimento das metástases é um processo extremamente complexo e segue uma sequência obrigatória de eventos, que se inicia com a invasão local do tecido onde se localiza o tumor primário, com posterior migração das células metastáticas através da corrente sanguínea, linfática ou espaço peritoneal, finalizando com sua adesão e proliferação no órgão alvo. Já no novo local, essas células precisam ser capazes de evadir a resposta imune do hospedeiro, e também os sinais apoptóticos, para que possam sobreviver (HUNTER; CRAWFORD; ALSARRAJ, 2008).



**Figura 4. Cascata metastática do câncer de mama.** Fonte: (SCULLY; BAY; YIP; YU, 2012) Adaptada.

O processo de invasão do tecido circundante ao tumor primário se inicia com as células tumorais invasivas alterando sua adesão célula-célula e a adesão celular à matriz extracelular (MEC). As moléculas de adesão celular (CAMs) foram descritas como importantes mediadores nesses eventos, sendo cruciais para a formação de metástases do câncer de mama (LI; FENG, 2011).

A glicoproteína de membrana E-caderina desempenha um papel relacionado à manutenção da polaridade e integridade epitelial. Moléculas de E-caderina presentes nas células adjacentes são unidas através de íons de cálcio, formando junções aderentes. Na porção intracelular, a E-caderina se liga ao citoesqueleto de actina através de cateninas, esse complexo confere estabilidade às junções célula-célula e desencadeia sinais intracelulares (LI; FENG, 2011). No câncer de mama, a expressão diminuída dessa molécula foi associada como um fator crucial na progressão do câncer de mama e desenvolvimento de metástases, estando associada a um prognóstico ruim (GOULD ROTHBERG; BRACKEN, 2006; HERZIG; SAVARESE; NOVATCHKOVA; SEMB *et al.*, 2007).

A P-caderina, outra glicoproteína pertencente ao subgrupo das caderinas clássicas, também está presente na glândula mamária normal e tem sua expressão restrita à células mioepiteliais e células basais, mas em carcinomas de mama invasivos de alto grau, tem sua expressão aumentada, estando relacionada com maior intensidade de invasão e migração celular, além da agressividade tumoral, resultando também em um pior prognóstico (PAREDES; CORREIA; RIBEIRO; ALBERGARIA *et al.*, 2007; TURASHVILI; MCKINNEY; GOKTEPE; LEUNG *et al.*, 2011).

A adesão à MEC também é alterada no processo de invasão. Essa adesão é mediada por integrinas, proteínas transmembranas, como, por exemplo, a fibronectina e a laminina (MEGO; MANI; CRISTOFANILLI, 2010). Para que a célula seja capaz de penetrar o tecido, a MEC precisa ser degradada, e isso ocorre através da ação de metaloproteinases (MMPs) e do sistema ativador do plasminogênio da uroquinase (uPA) (OSKARSSON, 2013). A sinalização das integrinas é capaz de cooperar com a expressão e regulação da atividade das MMPs (LI; FENG, 2011).

Logo após o processo de invasão, a cascata metastática evolui para a migração das células tumorais do sítio primário. No tumor de mama, essa migração celular se inicia principalmente em células da borda do tumor primário, e pode ocorrer tanto de maneira isolada, quanto de maneira coordenada (MCSHERRY; DONATELLO; HOPKINS; MCDONNELL, 2007). Em ambas as

formas de migração, a primeira etapa consiste na extensão de prolongamentos citoplasmáticos, conhecidos como filopódios e lamelipódios (NOBES; HALL, 1995).

Esse processo é seguido pela estabilização dessa interação entre os prolongamentos celulares e a MEC, degradação enzimática da matriz adjacente e posterior contração dessa rede de ligações, fazendo com que a célula consiga se arrastar para frente. Logo após essas etapas, as ligações são desfeitas e o processo se reinicia, permitindo, assim, a movimentação celular (MCSHERRY; DONATELLO; HOPKINS; MCDONNELL, 2007).

As principais diferenças entre a migração isolada e a coordenada, estão no fato de que, nesta última, as células migram através dos vasos sanguíneos ou linfáticos, ligadas umas às outras através de junções intercelulares, formando êmbolos, diferente das células individuais, que se movem independentemente, podendo alcançar espaços menores e distâncias maiores (BELL; WAIZBARD, 1986; FENTEANY; JANMEY; STOSSEL, 2000).

A transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) é descrita como uma via importante para a cascata metastática, tanto na invasão celular, quanto em sua migração. Nesse processo, as células sofrem alterações em seu fenótipo epitelial, passando a assumir um fenótipo semelhante ao mesenquimal (YILMAZ; CHRISTOFORI, 2010).

Na TEM, a adesão célula-célula é desfeita, são perdidos marcadores epiteliais como a E-caderina e adquiridos marcadores mesenquimais, como a Vimentina e N-caderina. A polaridade da célula também é alterada, para que seja iniciada a remodelação do citoesqueleto, permitindo a migração (SCULLY; BAY; YIP; YU, 2012). Finalmente, as MMPs são ativadas, alterando a adesão à matriz e formando canais que permitirão que essas células, agora em formato alongado semelhante a fibroblastos, possam se mover (IWATSUKI; MIMORI; YOKOBORI; ISHI *et al.*, 2010).

A interação da célula maligna com o microambiente, tanto no local primário quanto no local metastático, também é um fator crítico para o desenvolvimento das lesões secundárias. No final da década de 1980, foi postulada a teoria “semente e solo”, na qual as células metastáticas (sementes) só seriam capazes de gerar uma metástase quando encontrassem um microambiente favorável (solo) (PAGET, 1989). Atualmente, o papel do microambiente que irá receber essas células cancerosas vem sendo discutido como fator decisivo para a formação das metástases.

No osso, o sucesso da formação de metástases depende da interação entre as células tumorais e os componentes estromais do tecido, como osteoclastos e osteoblastos, influenciando o crescimento e a dormência dessas células (SCULLY; BAY; YIP; YU, 2012). Nas metástases cerebrais, vias moleculares coordenam tanto as células cancerosas quanto as células do estroma circundante, células imunes e matriz extracelular (HOSONAGA; SAYA; ARIMA, 2020).

As células tumorais também são capazes de secretar substâncias que atuarão em tecidos distantes, de forma a preparar um nicho pré-metastático. Células do tumor primário podem induzir a expressão de MMPs em células endoteliais pulmonares e macrófagos antes mesmo do início da invasão deste órgão (HIRATSUKA; NAKAMURA; IWAI; MURAKAMI *et al.*, 2002).

O tropismo tecidual apresentado pelas células de câncer de mama no desenvolvimento de metástases parece ter relação não só com a expressão de genes específicos, mas também com a presença de quimiocinas, que direcionarão as células tumorais para tecidos que expressem seus receptores (MINN; GUPTA; SIEGEL; BOS *et al.*, 2005; MÜLLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N. *et al.*, 2001).

- ***Linhagem celular E0771***

O camundongo C57BL/6 foi a primeira linhagem endogâmica a ter seu genoma sequenciado e é a mais amplamente utilizada experimentalmente (LE NAOUR; ROSSARY; VASSON, 2020). Dentre as poucas linhagens de tumor de mama resultantes desse background está a E0771.

Essas células vêm sendo usadas há décadas (HOMBURGER, 1948; SUGIURA; STOCK, 1952), mas ainda são apresentadas caracterizações controversas em relação a sua classificação e presença de receptores hormonais, sendo considerada ora como o subtipo triplo negativo, ora como o Luminal, próximo ao fenótipo Luminal B (LE NAOUR; ROSSARY; VASSON, 2020).

A classificação molecular triplo-negativa é a mais aceita, visto que alguns autores conseguiram comprovar que o gene que codifica o RE $\alpha$  é transcrito nessas células tumorais e que essa proteína pode ser identificada, entretanto essa expressão seria extremamente mais fraca do que em células já descritas como RE $\alpha$ + (GU; YOUNG; BUSBY; COVINGTON *et al.*, 2009; HIRAGA; NINOMIYA, 2019). Outros autores ainda demonstraram que, mesmo presente nas células E0771,

o RE  $\alpha$  estaria localizado no citoplasma e não no núcleo, como é encontrado em tumores mamários primários de humanos (JOHNSTONE; SMITH; CAO; BURROWS *et al.*, 2015).

A linhagem E0771 também foi caracterizada para a expressão de outros marcadores. Johnstone e colaboradores (2015) identificaram, através de imunofluorescência e *western blot*, a presença de TP53 mutante nessas células, gene supressor de tumor (JOHNSTONE; SMITH; CAO; BURROWS *et al.*, 2015). A expressão da proteína de morte programada (PD-1) e seu ligante (PDL-1), reguladores-chave na capacidade tumoral de regular negativamente a resposta imune adaptativa e interromper as vias de *checkpoint* das células T, também foi positiva para a linhagem E0771 (GRAY; GONG; HATCH; NGUYEN *et al.*, 2016).

O implante mamário ortotópico dessas células, ou seja, injeções aplicadas diretamente na almofada mamária de camundongos, tem uma alta taxa de absorção que se aproxima de 100%, levando a grandes tumores em poucas semanas e, ainda, fornecendo a possibilidade da interação intercelular nesse microambiente completo (HOOVER; GULLICKSON; KORNBLUTH, 2012; NACHAT-KAPPES; PINEL; COMBE; LAMAS *et al.*, 2012)

Por se tratar de um modelo singênico, os animais são imunocompetentes, sendo possível avaliar o papel da imunidade do hospedeiro no desenvolvimento do tumor (LE NAOUR; ROSSARY; VASSON, 2020).

O desenvolvimento do tumor primário de E0771 parece estar pouco envolvido com células da imunidade inata, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, entretanto, essas células são importantes para a disseminação de metástases pulmonares (STÖTH; FREIRE VALLS; CHEN; HIDDING *et al.*, 2019).

As células Natural Killer (NK) apresentam um papel relevante para o controle do desenvolvimento do tumor primário e também da disseminação metastática, visto que a depleção dessas células, e também o *knockout* da molécula Natural Killer Lytic-Associated Molecule (NKLAM) – que possui papel importante na atividade citotóxica das células NK –, levou a um aumento do tumor primário e aumento do número de células E0771 no sangue e pulmões (HOOVER; GULLICKSON; KORNBLUTH, 2012; TU; RAHIM; SAYED; MAHMOUD *et al.*, 2017)

Camundongos portadores de tumor E0771 também tiveram sua população de linfócitos T avaliada, sendo observado um aumento de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> com o crescimento tumoral. A proporção dessas células foi diferente durante a progressão do tumor, sendo os estágios iniciais de desenvolvimento mais caracterizados pela presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, demonstrando o intenso papel antitumoral desta subpopulação (KARKENI; MORIN; BOU TAYEH; GOUBARD *et al.*, 2019). Os estágios tardios foram marcados pela presença de células T CD4<sup>+</sup>, iniciando com uma subpopulação predominante de linfócitos Th1 e evoluindo para subtipos de Treg e células Th17 (HUANG; MA; ZHANG; YE *et al.*, 2015).

Como componente importante do microambiente tumoral da mama, as interações dessa linhagem celular com adipócitos também foram analisadas. Xiong e colaboradores descreveram essa comunicação, através de adipocinas, como pró tumoral, acelerando o crescimento do tumor, aumentando sua vascularização e contribuindo para a migração das células E0771 (XIONG; RUSSELL; MCDONALD; COWART *et al.*, 2017).

A comunicação com fibroblastos, através da secreção de fatores parácrinos, também foi capaz de aumentar a viabilidade das células E0771, aumentando o crescimento tumoral e induzindo resistência terapêutica (FOURIE; DAVIS; KRIEL; ENGELBRECHT, 2019).

A proliferação das células E0771 é semelhante a outros tumores murinos, tendo seu tamanho correlacionado com a densidade celular, mas também com a proporção de tecido necrótico (MAURER-SCHULTZE; BASSUKAS; LOER, 1990). O crescimento do tumor parece ter relação com características do hospedeiro, como, por exemplo, o peso corporal do camundongo (BASSUKAS; MAURER-SCHULTZE, 1992).

A capacidade de disseminação dessa linhagem celular possui características semelhantes à doença humana, com múltiplos sítios metastáticos, sendo os pulmões, peritônio, ossos e cérebro os locais de maior ocorrência (LE NAOUR; ROSSARY; VASSON, 2020).

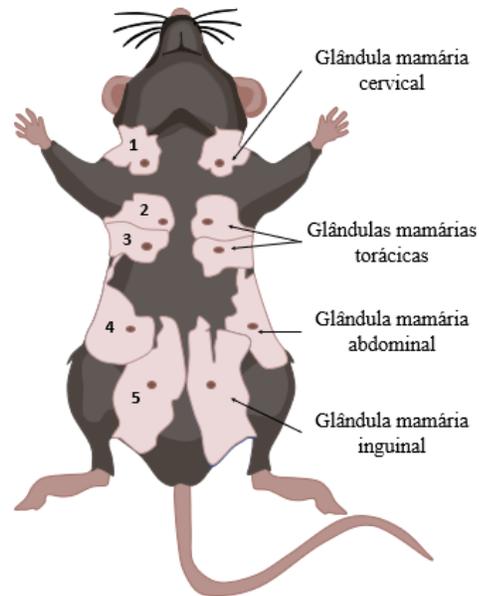
- ***Parênquima mamário de camundongos***

A glândula mamária é um órgão secretor complexo, composto por uma estrutura parenquimatosa que invade o coxim de tecido adiposo e conta com a infiltração de células endoteliais vasculares, fibroblastos e células imunes, e que, ao longo do desenvolvimento dos

camundongos, passa por mudanças contínuas em sua estrutura e função (MACIAS; HINCK, 2012; RICHERT; SCHWERTFEGER; RYDER; ANDERSON, 2000).

Os camundongos possuem cinco pares de mamas, que estão localizadas na camada adiposa subcutânea, onde três pares estão situados na região superior e dois pares na região inferior (RICHERT; SCHWERTFEGER; RYDER; ANDERSON, 2000; RILLEMA, 1994). As glândulas mamárias podem ser identificadas anatomicamente pela numeração de 1 a 5, ou por regiões (cervical, torácica, abdominal e inguinal), como demonstrado na Figura 4 (HONVO-HOUÉTO; TRUCHET, 2015; PLANTE; STEWART; LAIRD, 2011).

As glândulas abdominais (número 4) são as mais utilizadas para análises, porém as glândulas torácicas (números 2 e 3) também podem ser utilizadas mesmo apresentando alguns músculos interdigitados. As glândulas mamárias cervicais (número 1) são menos utilizadas devido à dificuldade de retirá-las, pela forte associação com os músculos (PLANTE; STEWART; LAIRD, 2011).



**Figura 5. Identificação das glândulas mamárias de camundongos.** À esquerda por número e à direita por região. Fonte: Acervo pessoal.

O desenvolvimento mamário murino se inicia no meio da gestação, no dia embrionário 10,5 (E10,5), onde são definidas linhas de leite bilaterais. Por volta do E11 – E12, células ectodérmicas se unem em cinco pares de placóides mamários, que, após 1 dia, formam montículos elevados que se afundam na derme, originando brotos cercados por um mesênquima mamário compactado e altamente especializado. Nos machos, por volta do E15,5, o primórdio mamário é destruído, já, nas fêmeas, começa a proliferar e invadir o coxim de tecido adiposo mais próximo, onde vai se ramificar e formar um lúmen, gerando uma árvore ductal oca ao nascimento (SPINA; COWIN, 2021).

Após o nascimento, ocorre um amadurecimento rápido do coxim adiposo mamário e o epitélio cresce de maneira uniforme e ramificada até atingir a puberdade (DAWSON; VISVADER, 2021).

Nessa nova fase, que ocorre entre a 3ª e a 7ª semana de idade, são formados os botões terminais proliferativos (TEBs), por meio do estímulo do estrogênio, do hormônio do crescimento, e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1. Os TEBs irão conduzir a morfogênese ramificada da glândula mamária através do coxim adiposo – eles possuem alta taxa de proliferação celular e são formados por diversas camadas de células epiteliais envoltas por uma camada de células-tronco pluripotentes, as “cap cells”, que, futuramente, irão se diferenciar em células epiteliais ou mioepiteliais (RICHERT; SCHWERTFEGER; RYDER; ANDERSON, 2000; RUSSO; RUSSO, 1996).

Por volta da 12ª semana, os ductos mamários já se estenderam por todo coxim adiposo, formando estruturas denominadas lóbulos, que podem ser identificadas como primário, secundário e terciário (RICHERT; SCHWERTFEGER; RYDER; ANDERSON, 2000). Os primários possuem poucos ductos e uma única camada de células epiteliais em um estroma esparso de tecido conjuntivo frouxo. Os lóbulos secundários e terciários possuem um número aumentado de ductos, que se apresentam em um formato mais arredondado, formados por uma camada epitelial cuboide recoberta de uma camada mioepitelial, em um estroma mais denso e rico em fibroblastos (RICHERT; SCHWERTFEGER; RYDER; ANDERSON, 2000).

O epitélio mamário adulto sofre proliferação cíclica, onde se ramifica e regride em resposta ao ciclo ovariano, o que ocorre a cada 4-5 dias nos camundongos (MACIAS; HINCK, 2012). Em

resposta ao aumento da progesterona, durante o metaestro e diestro, ocorre a proliferação dos ductos, gerando ramos terciários e, assim que os níveis desse hormônio caem, tem-se o aumento de apoptose e regressão (DAWSON; VISVADER, 2021).

As células epiteliais das glândulas mamárias são capazes de sintetizar e secretar produtos lácteos. Elas formam estruturas com lúmens e são envoltas externamente por uma camada basal de elementos contráteis, que são as células mioepiteliais (HONVO-HOUÉTO; TRUCHET, 2015; RICHERT; SCHWERTFEGER; RYDER; ANDERSON, 2000).

- ***Microambiente tumoral***

As células tumorais são o principal componente deste microambiente. Para que uma célula normal evolua para um estado neoplásico, ela precisa apresentar os chamados *hallmarks of cancer* (características do câncer), sendo os principais: 1) sustentação dos sinais de proliferação; 2) evasão de supressores de crescimento; 3) ativação de invasão e metástase; 4) indução de angiogênese; 5) imortalidade replicativa; 6) resistência à morte celular; 7) reprogramação do metabolismo celular e 8) evasão da destruição imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, como podemos observar na Figura 6, “instabilidade do genoma” e “inflamação promotora de tumor” foram duas características adicionadas recentemente a essa lista, em um artigo onde Hanahan discute diversas outras marcas das células tumorais (HANAHAN, 2022).



**Figura 6. Características do câncer.** As células cancerosas adquirem modificações genéticas que conferem a elas vantagens, essas características foram nomeadas *hallmarks of cancer*. Fonte: (HANAHAN, 2022) Adaptada.

O tumor não é composto apenas por populações de células cancerosas. Este microambiente complexo e heterogêneo conta com diversas células residentes, células infiltradas, componentes da MEC e fatores secretados por todos estes elementos, como representado na Figura 7 (ANDERSON; SIMON, 2020).

O microambiente tumoral (MAT) é, então, definido por esse conjunto de células e todas as suas interações, de forma que, principalmente as células tumorais, passem a regê-lo com o objetivo de favorecer a sua sobrevivência e progressão do tumor (QUAIL; JOYCE, 2013).

Um importante componente do microambiente tumoral são as células do endotélio vascular, responsáveis por orquestrar a formação de vasos sanguíneos, essenciais para a manutenção da homeostase metabólica, fornecimento de nutrientes e transporte de células imunes (ANDERSON; SIMON, 2020).

A vasculatura tumoral é distorcida e apresenta diferenças estruturais, funcionais e genéticas da vasculatura normal, o que pode dificultar a chegada de oxigênio, levando a uma condição de hipóxia dentro do tumor, assim, estimulando ainda mais a liberação de fatores pró-angiogênicos, resultando no aumento da vasculatura anormal, em um ciclo vicioso (SCULLY; BAY; YIP; YU, 2012).

É também através dos vasos sanguíneos que células tumorais conseguem migrar para tecidos distantes, concretizando uma etapa importante para o estabelecimento das metástases (DE CASTRO JUNIOR; PUGLISI; DE AZAMBUJA; EL SAGHIR *et al.*, 2006)

Os fibroblastos associados ao câncer (FACs), tipo de célula mais abundante no estroma do câncer de mama, também desempenham funções importantes para o desenvolvimento e invasão tumoral, como a secreção de quimiocinas e fatores de crescimento (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015).

Os FACs podem influenciar o perfil transcricional de células de câncer de mama, além de estimular a angiogênese e desempenhar um papel importante na formação de metástases cerebrais desse tipo de tumor (CHOI; LEE; GAO; KIM *et al.*, 2014; FOLGUEIRA; MAISTRO; KATAYAMA; ROELA *et al.*, 2013).

A matriz extracelular (MEC), rede de proteínas que envolve e estabiliza as células, vem tendo suas funções ampliadas, mostrando ser uma estrutura dinâmica e fundamental para o crescimento celular, proliferação e migração (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015). No câncer, ela é desorganizada e desregulada, principalmente pela interação com FACs e células imunes (LU; WEAVER; WERB, 2012).

A integridade da MEC é crucial no desenvolvimento do câncer, visto que a degradação do seu principal componente, o colágeno, leva à invasão das células tumorais (TANJORE; KALLURI, 2006). Além disso, a MEC anormal é capaz de impedir que as células T passem pelo processo de diferenciação e maturação, atrapalhando, portanto, o sistema imunológico no controle das células tumorais (LU; WEAVER; WERB, 2012).

O tecido mamário é composto, em grande parte, por tecido adiposo branco, logo, o microambiente tumoral da mama também inclui adipócitos, responsáveis pela secreção de

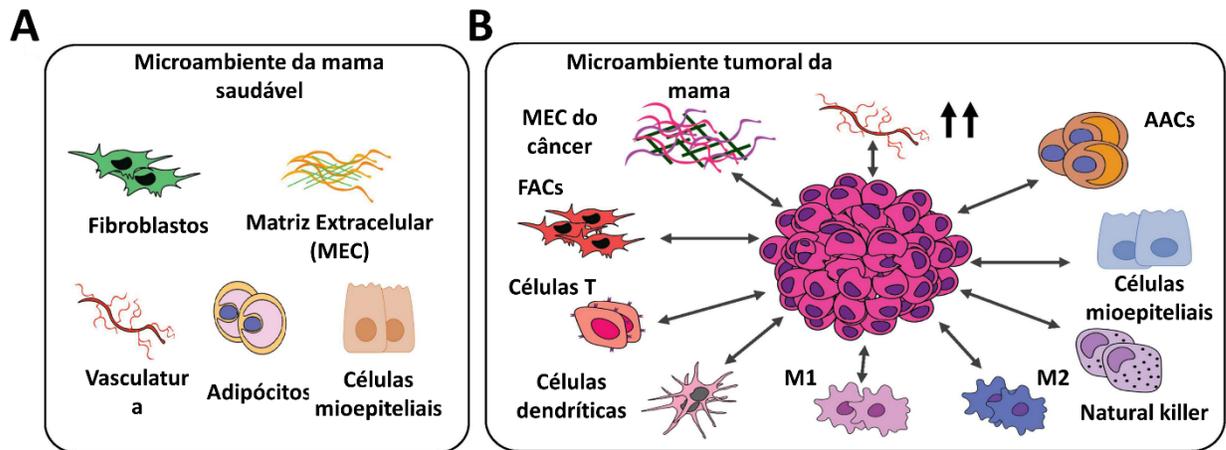
metabólitos, enzimas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas que irão promover a progressão tumoral (ANDERSON; SIMON, 2020). A comunicação com as células de câncer é recíproca, podendo induzir à lipólise das células adiposas, liberando ácidos graxos, que serão absorvidos pelas células tumorais e utilizados, por exemplo, na produção de energia (ANDERSON; SIMON, 2020).

Células do sistema imune também estão infiltradas no microambiente tumoral. Macrófagos associados ao tumor estão localizados, principalmente, no estroma tumoral periférico e próximos aos vasos sanguíneos, auxiliando o extravasamento da célula maligna (QUAIL; JOYCE, 2013). Eles produzem fatores como VEGF, citocinas e enzimas, que promoverão a angiogênese, remodelação da MEC, supressão imunológica e metástases (SOLINAS; GERMANO; MANTOVANI; ALLAVENA, 2009).

As células dendríticas (CD), assim que finalizam sua maturação, desempenham papel importante na indução de respostas antitumorais, apresentando antígenos para as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, que são ativadas para destruir as células tumorais (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015).

Os linfócitos mais presentes no MAT são as células T em seus diferentes fenótipos (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015). O T<sub>reg</sub>, no microambiente tumoral, é capaz de bloquear respostas antitumorais, não só suprimindo a atividade de células imunes, mas, também, ativando células neoplásicas e promovendo metástases (JIANG; SHAPIRO, 2014; TAN; ZHANG; STRASNER; GRIVENNIKOV *et al.*, 2011).

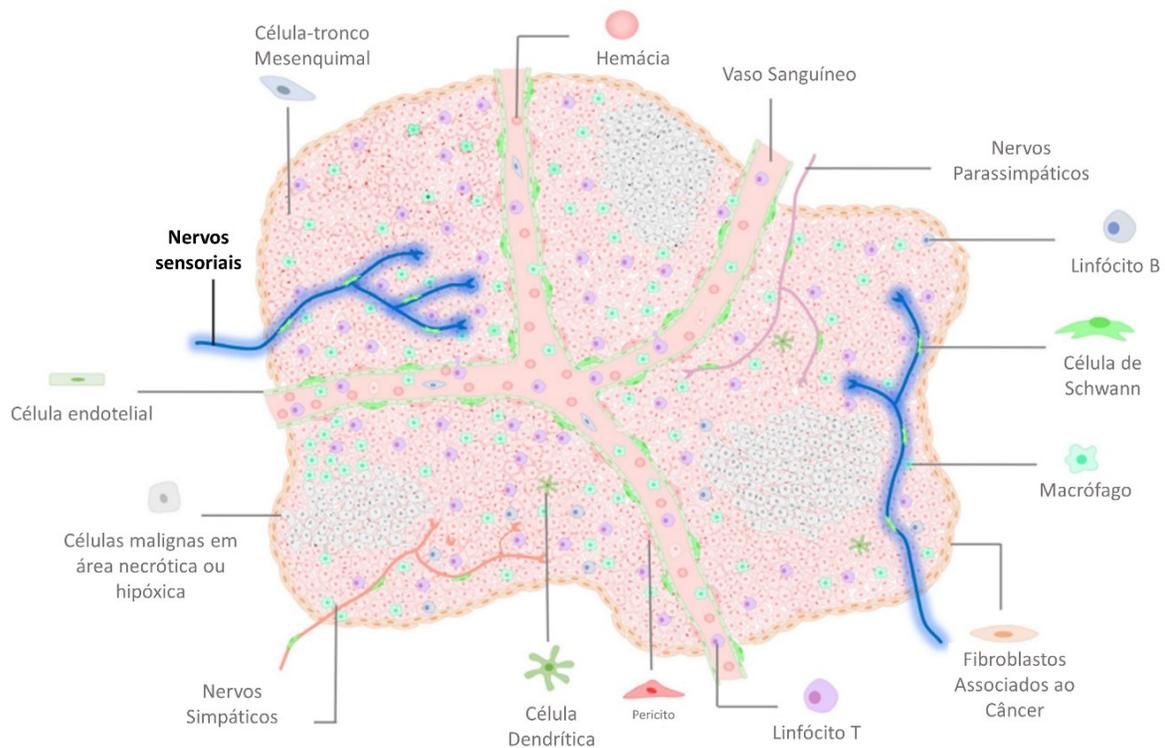
As células T CD8<sup>+</sup> estão associadas à maior sobrevida no câncer de mama, e esse efeito é regulado pelo equilíbrio entre sinais co-estimulatórios e co-inibitórios nos *checkpoints* imunológicos. Moléculas de *checkpoint* imunológico, como PD-1, inibem a função das células T, evitando reações imunes inadequadas ou limitando sua extensão (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015).



**Figura 7. Microambiente do tumor mamário.** Representação esquemática dos componentes mais abundantes no microambiente da glândula mamária saudável (A). Componentes frequentemente transformados no microambiente do tumor de mama (B). Fonte: (MOCCIA; HAASE, 2021) Adaptada.

Estudos anteriores demonstraram que a presença de fibras nervosas sensoriais está relacionada a um pior prognóstico de câncer de mama, e potencial metastático com maior taxa de invasão de linfonodos (PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015).

Além das células do estroma e os componentes da MEC, o microambiente tumoral conta com a presença de fibras nervosas, como representado na Figura 8 (HUANG; SU; CUI; SHEN *et al.*, 2014). Crescentes estudos vêm evidenciando essa interação entre o sistema nervoso periférico (SNP) com a progressão de diversos tumores, como o de mama, próstata, pâncreas, colorretal e gástrico (AYALA; DAI; POWELL; LI *et al.*, 2008; MARCHESI; PIEMONTI; MANTOVANI; ALLAVENA, 2010; PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015; SEIFERT; BENEDIC; EFFERT, 2002).



**Figura 8. Inervação sensorial no microambiente tumoral.** Ilustração esquemática mostrando a complexidade do microambiente tumoral com seus componentes conhecidos, destacando um novo elemento, os nervos sensoriais dentro do tumor. Fonte: (PRAZERES; LEONEL; SILVA; ROCHA et al., 2020) Adaptada.

- ***Inervação sensorial e câncer***

Com a função de conectar o corpo e o ambiente externo ao Sistema Nervoso Central (SNC), o sistema nervoso periférico é composto por gânglios nervosos e nervos, que possuem ramos motores e sensoriais (CATALA; KUBIS, 2013; CARRIEL; GARZÓN; ALAMINOS; CORNELISSEN, 2014).

Os nervos sensoriais são responsáveis, principalmente, pela sensação de dor, temperatura e pressão e, como nervos aferentes, a informação sensorial se propaga no sentido dos tecidos periféricos para o SNC. Os corpos celulares desses neurônios estão localizados no gânglio da raiz dorsal (*dorsal root ganglia / DRG*), e seus axônios se prolongam por toda a periferia a partir do corpo celular (NASCIMENTO; MAR; SOUSA, 2018).

As fibras nervosas sensoriais possuem muitos VGSCs, que estão associados a respostas térmicas, mecânicas e químicas (DJOUHRI; FANG; OKUSE; WOOD *et al.*, 2003; FELTS; YOKOYAMA; DIB-HAJJ; BLACK *et al.*, 1997; ISOM, 2001; MIAO; GAO; WU; LU *et al.*, 2010). Dentre as isoformas mais presentes no SNP, o canal Nav1.8, que pertencente à família Nav, merece destaque (ERICKSON; DEITEREN; HARRINGTON; GARCIA-CARABALLO *et al.*, 2018). Sua expressão está associada exclusivamente a neurônios sensoriais, não sendo encontrado no SNC (AKOPIAN; SIVILOTTI; WOOD, 1996; MIAO; GAO; WU; LU *et al.*, 2010). O DRG é o local de maior concentração de sua expressão, mas também está presente em cerca de dois terços dos corpos celulares aferentes sensoriais do gânglio nodoso (DJOUHRI; FANG; OKUSE; WOOD *et al.*, 2003; GAUTRON; SAKATA; UDIT; ZIGMAN *et al.*, 2011; STIRLING; FORLANI; BAKER; WOOD *et al.*, 2005). O Nav1.8, para além do gânglio, é encontrado também em muitas terminações sensoriais em órgãos como pulmões, pâncreas, língua, trato digestório, bexiga, coração, rins, fígado, suprarrenais, pele, vesícula biliar, tecido adiposo branco e linfonodos (GAUTRON; SAKATA; UDIT; ZIGMAN *et al.*, 2011).

Ao longo das últimas décadas, a correlação entre as fibras nervosas sensoriais e o desenvolvimento de processos como a neuropatia, artrite, lesões teciduais e câncer vem sendo bastante abordada (BOOTH; MAY; YAO, 2015; CAMERLINGO; NEMNI; FERRARO; CASTO *et al.*, 1998; MUKOUYAMA; SHIN; BRITSCH; TANIGUCHI *et al.*, 2002; PARADA; VIVANCOS; TAMBELI; CUNHA *et al.*, 2003; SCHAIBLE, 2014).

No fim da década de 1940, Denny Brown associou a neuropatia sensorial periférica com o aumento da incidência do câncer (DENNY-BROWN, 1948). Essa correlação continuou a ser abordada em estudos futuros, onde quase 35% dos pacientes com neuropatia sensorial periférica desenvolvem câncer (CAMERLINGO; NEMNI; FERRARO; CASTO *et al.*, 1998). Atualmente, um número crescente de pesquisas vem evidenciando, através de análise celular, a associação direta do sistema nervoso à progressão de diversos tipos de câncer, como o de mama, próstata, pâncreas, colorretal e gástrico (ALBO; AKAY; MARSHALL; WILKS *et al.*, 2011; AYALA; DAI; POWELL; LI *et al.*, 2008; ONDICOVA; MRAVEC, 2010; ZHAO; HAYAKAWA; KODAMA; MUTHUPALANI *et al.*, 2014). Inclusive, o mau prognóstico da doença foi relacionado a expressão aumentada de neuropeptídeos e células neurais (ENTSCHLADEN; PALM; LANG; DRELL *et al.*,

2006; GRABOWSKI; MAASER; HANSKI; STEIN *et al.*, 2005; GRABOWSKI; SCHÖNFELDER; AHNERT-HILGER; FOSS *et al.*, 2002).

Seguindo a mesma perspectiva, com o objetivo de entender a atuação da inervação no microambiente tumoral, pesquisas recentes levam o olhar para o papel da inervação autônoma (MAGNON, 2015; MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013). Entretanto, o componente sensorial da inervação ainda precisa ter sua atividade estabelecida.

Embasando esses novos direcionamentos, Pundavela e colaboradores demonstraram que os neurônios sensoriais podem liberar fatores reguladores significativos para a progressão tumoral (PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015). Essas células nervosas, através da liberação de neuropeptídeos como a substancia P e o CGRP conseguem regular a função vascular, componente fundamental para o desenvolvimento do tumor (AUSTIN; ELLIOTT; NICOLAOU; GRABOWSKA *et al.*, 2017). Há muitas décadas a substancia P vem sendo relacionada à migração de células em cânceres de pulmão, mama e colón, sendo inclusive relevante para o desenvolvimento de metástases (DRELL; JOSEPH; LANG; NIGGEMANN *et al.*, 2003; ENTSCHLADEN; DRELL; LANG; JOSEPH *et al.*, 2004; RUFF; SCHIFFMANN; TERRANOVA; PERT, 1985). O CGRP exibe um perfil pró-inflamatório e também auxilia no processo de migração dessas células (FOSTER; MANDAK; KROMER; ROT, 1992; NAGAKAWA; OGASAWARA; MURATA; FUSE *et al.*, 2001). Ademais, endogenamente liberados, peptídeos opióides se ligam a receptores nos neurônios sensoriais sendo capazes de estimular uma quimioatração e migração de células tumorais pulmonares (ENTSCHLADEN; DRELL; LANG; JOSEPH *et al.*, 2004; ENTSCHLADEN; PALM; LANG; DRELL *et al.*, 2006; RUFF; SCHIFFMANN; TERRANOVA; PERT, 1985).

Uma diferenciação válida a ser feita é em relação a inervação tumoral supracitada e o processo conhecido como invasão perineural, considerado um indicador de mau prognóstico e metástase (HUANG; SU; CUI; SHEN *et al.*, 2014; ZHAO; YANG; LIANG; DU *et al.*, 2014). Resumidamente, na invasão perineural, as fibras nervosas funcionam como guias para a migração das células tumorais, possibilitando rotas metastáticas e infiltração no SNC (BAPAT; HOSTETTER; VON HOFF; HAN, 2011; CEYHAN; DEMIR; ALTINTAS; RAUCH *et al.*, 2008; MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013).

Por ser um órgão amplamente innervado, tanto por fibras sensoriais (na pele e mamilos) quanto por fibras simpáticas (nos vasos sanguíneos e ductos), a mama vem despertando interesse dos pesquisadores quando se trata da relação entre o sistema nervoso e o câncer (HUANG; SU; CUI; SHEN *et al.*, 2014; PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015; SARHADI; SHAW DUNN; LEE; SOUTAR, 1996; ZHAO; YANG; LIANG; DU *et al.*, 2014).

Pundavela e colaboradores, avaliando tumores mamários, encontraram um elo entre a presença de fibras nervosas e um prognóstico ruim, com aumento do potencial metastático e taxas maiores de invasão de linfonodos (PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015). Nesse e em outros trabalhos, foi estabelecida uma relação direta entre a agressividade tumoral e o número de fibras nervosas, que se localizavam principalmente no estroma tumoral, próximas a vasos sanguíneos e adipócitos (PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015; ZHAO; YANG; LIANG; DU *et al.*, 2014). Em oposição a esses resultados, Erin e colaboradores demonstraram que fibras sensoriais sensíveis à capsaicina seriam capazes de inibir metástases derivadas de tumores mamários (ERIN; AKDAS BARKAN; HARMS; CLAWSON, 2008; ERIN; BOYER; BONNEAU; CLAWSON *et al.*, 2004).

Através de imunomarcações para neurônios sensoriais positivos para PGP9.5, CGRP e neurofilamento 200 (NF200), foi demonstrada a presença dessa inervação, tanto em cortes histológicos de tumores mamários humanos quanto em tumores derivados de um modelo murino de xenoinxerto. Os dados revelam que o número de fibras nervosas pode apresentar relação com uma maior densidade microvascular e também com a alta expressão do VEGF-A (AUSTIN; ELLIOTT; NICOLAOU; GRABOWSKA *et al.*, 2017; ZHAO; HAYAKAWA; KODAMA; MUTHUPALANI *et al.*, 2014). In vitro, células tumorais mamárias foram capazes de aumentar a neuritogênese, a ramificação colateral dos neurônios sensoriais e as respostas dos canais iônicos desses neurônios no DRG, características que apresentam relação com a dor no câncer e a angiogênese tumoral (AUSTIN; ELLIOTT; NICOLAOU; GRABOWSKA *et al.*, 2017; TODA; SUZUKI; HOSONO; HAYASHI *et al.*, 2008).

As células de câncer, através da liberação de mediadores como o fator de crescimento de nervo (NGF) e o VEGF, propiciam a invasão neural no tumor (ADRIAENSSENS; VANHECKE; SAULE; MOUGEL *et al.*, 2008; PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015). No entanto, fibras nervosas também podem contribuir com a proliferação de células tumorais e

seu potencial metastático no câncer de mama, através da liberação de noradrenalina, dopamina e Substancia P (ENTSCHLADEN; DRELL; LANG; JOSEPH *et al.*, 2004; ONDICOVA; MRAVEC, 2010; VANHECKE; ADRIAENSSENS; VERBEKE; MEIGNAN *et al.*, 2011). A relação entre o componente sensorial da inervação e os tumores mamários pode ser ainda embasada por estudos *in vitro* que comprovaram que diferentes linhagens celulares de câncer de mama expressam diferenças nos efeitos neurotróficos e na secreção de NGF (PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015).

No entanto, os estudos supracitados, que discutem a relação entre fibras nervosas e o desenvolvimento tumoral mamário, ainda podem ser mais aprofundados a fim de identificar o papel dessas fibras sensoriais para o desenvolvimento, tanto do tumor primário, quanto para a formação de metástases.

### 3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama feminino é o tipo de câncer mais diagnosticado no mundo. Em 2020, aproximadamente 2,3 milhões de mulheres receberam o diagnóstico e 685 mil mortes ocorreram em decorrência da doença, números que tornam essa a causa mais comum de morte por câncer em mulheres (IARC 2020).

No Brasil, o câncer de mama é a principal causa de morte por câncer na população feminina de todas as regiões do país, exceto na região Norte, onde essa posição é ocupada pelo câncer de colo do útero (INCA, 2020). Para o ano de 2021, foram estimados 66.280 novos casos da doença (INCA, 2020).

Com o objetivo de identificar novos alvos terapêuticos, para esse e outros tipos de tumores, pesquisas recentes têm se dedicado a desvendar a complexidade do microambiente tumoral, destacando a interação das células neoplásicas com outros elementos celulares, como, por exemplo, componentes do sistema nervoso (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012; PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015; WANG; ZHAO; ZHANG; WEI *et al.*, 2017).

Dados publicados por nosso grupo (PRAZERES; LEONEL; SILVA; ROCHA *et al.*, 2020) utilizando camundongos geneticamente modificados mostraram que fibras nervosas sensoriais, expressando canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.8, estão presentes no microambiente tumoral de melanoma murino B16F10, e que a depleção química e genética desses neurônios levou ao aumento do crescimento do melanoma e angiogênese tumoral.

Dessa forma, entender a interação dos neurônios sensoriais com o microambiente tumoral da mama e o seu papel na progressão dessa doença e formação de metástases poderá fornecer novas possibilidades terapêuticas.

#### 4. OBJETIVOS

- ***Objetivo Geral***

Avaliar a presença da inervação sensorial no tumor de mama induzido pelo inóculo de células E0771 e sua participação na progressão da doença e no desenvolvimento de metástases.

- ***Objetivos Específicos***

- Localizar os nervos sensoriais no tumor mamário murino E0771 utilizando o modelo genético Nav1.8-Cre/TdTomato;

- Avaliar a expressão de Nav1.8 com dois diferentes momentos do desenvolvimento tumoral (14 e 28 dias);

- Realizar a depleção química dos nervos sensoriais e avaliar a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases espontâneas;

- Avaliar as taxas de angiogênese (CD31) e proliferação celular (Ki67) no tumor primário;

- Analisar a expressão de P-caderina e E-caderina no tumor primário;

- Identificar e quantificar lesões metastáticas nos pulmões, fêmures, cérebro e fígado.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

- ***Animais***

Os animais C57BL/6J fêmeas do tipo selvagem (WT – Wild Type) foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerias. Os camundongos B6.TdTomato foram adquiridos do Jackson Laboratories. Os camundongos Nav1.8-Cre foram obtidos da Infrafrontier. Camundongos Nav1.8-Cre foram cruzados com camundongos B6.TdTomato para gerar camundongos Nav1.8-Cre/TdTomato, os quais possuíam os nervos sensoriais marcados em vermelho. Para os experimentos, os camundongos foram pareados por idade de 8 a 10 semanas. Ficaram alojados no Biotério do Departamento de Patologia do ICB / UFMG e foram mantidos sob ciclo de luz controlado (12:12 horas de ciclo claro/ escuro), tendo livre acesso à água e ração. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 44/2021.

- ***Manutenção dos animais***

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e ambiente controlado com livre acesso à água e ração *ad libitum*, durante todo o período do experimento. Para a realização deste estudo, os animais foram divididos em grupos (caixas) com 4 (quatro) animais cada. Para o primeiro experimento, os grupos foram denominados de acordo com os dias de desenvolvimento tumoral, sendo “14 dias” e “28 dias”. Para o segundo experimento, os grupos foram denominados de acordo com o tratamento recebido (RTX ou PBS), como “Teste” ou “Controle” em relação à depleção dos neurônios sensoriais. Após a divisão dos grupos, os animais foram observados diariamente, verificando: mortalidade, sinais clínicos, variações no peso corporal e no consumo de água e ração.

- ***Fenotipagem para Nav 1.8-Cre/TdTomato***

Uma pequena amostra tecidual das orelhas dos animais foi retirada, colocada em uma lâmina histológica com um pouco de PBS 1X, e montada com uma lamínula. Esse tecido foi analisado em um microscópio de fluorescência (EVOS® FL Cell Imaging Systeme) e os animais com fenótipo positivo – nervos sensoriais marcados pela fluorescência TdTomato – foram utilizados para o experimento.

- ***Linhagem celular e cultura***

A linhagem de tumor de mama murino E0771 foi fornecida pelo Laboratório de Imunometabolismo e Exercício da Universidade de São Paulo (USP). As células foram cultivadas à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> com *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de penicilina e estreptomicina.

- ***Análise do crescimento tumoral in vivo***

Para o desenvolvimento do tumor de mama, células E0771 foram inoculadas ortotópicamente na almofada de gordura da 4ª glândula mamária, na concentração de  $1 \times 10^6$  células diluídas em 50 µL de PBS 1x. O comprimento (L) e a largura (W) do tumor foram medidos a cada dois dias para determinar o volume (V) tumoral através da fórmula  $V = 0,5 \times (L \times W^2)$  (GAST; SILK; ZAROOR; RIEGLER *et al.*, 2018). A área tomoral foi determinada usando fotografias calibradas de cada tumor através o software Fiji®, versão 1.53 (National Institute of Health, Bethesda, MD). Para avaliar a presença dos nervos sensoriais em diferentes momentos do desenvolvimento tumoral, os tumores foram removidos com 14 e 28 dias.

- ***Depleção química dos nervos sensoriais***

Para a depleção química dos nervos sensoriais, os camundongos WT foram tratados com resiniferotoxina (RTX) conforme descrito anteriormente (BARAL; UMANS; LI; WALLRAPP *et al.*, 2018). Camundongos de 4 semanas de idade foram injetados por via subcutânea em dias consecutivos com doses crescentes de RTX (30, 70 e 100 µg / kg) dissolvido em 2% de DMSO com 0,15% de Tween 80 em PBS. Os animais do grupo controle foram injetados apenas com veículo. Após o tratamento foi respeitado um prazo 28 dias de recuperação antes da injeção de células E0771. Para confirmar a eficiência da depleção dos nervos sensoriais, após o período de recuperação, os camundongos dos grupos controle e teste foram submetidos a testes comportamentais para medir as respostas térmicas e mecânicas reduzidas. Para o calor nocivo, foi utilizado o teste de movimento da cauda (Tail Flick), conforme descrito (PACHECO; ROMERO; DUARTE, 2019). Para o teste mecânico foi utilizado o teste Randall e Selitto (RANDALL; SELITTO, 1957), usando um analgesímetro com um prensador de pata em forma de cone com uma ponta arredondada para aplicar uma força linearmente crescente na pata traseira. O peso em gramas

(g) e o tempo em segundos (s) necessários para desencadear a resposta nociceptiva foram determinados como o limiar nociceptivo.

- ***Microscopia de Imunofluorescência***

Os tumores foram retirados e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas a 4°C. Posteriormente, foram colocados em sacarose 30% por 48 horas a 4°C. Em seguida, foram incluídos em OCT (Optimal Cutting Temperature) e foram realizados cortes de 12µm em criostato. As criosecções foram bloqueadas por 2 horas em 3% BSA em PBS + 0,5% Triton, e imunomarcadas com os seguintes anticorpos: CD31 conjugado com o fluoróforo PE (BioLegend/ diluição 1: 100), Ki67 conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 700 (BD Biosciences/ diluição 1: 100), e os anticorpos primários que reconhecem P-Caderina (Invitrogen/ diluição 1:500) e E-Caderina (Invitrogen/ diluição 1:500). Nos cortes incubados com anti E-caderina e P-caderina, foram colocados anticorpos secundários anti IgG de camundongo conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 488. Todos os cortes foram lavados 3 vezes com pBS 1x e corados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) à 1 µg/mL. As lâminas foram fotografadas em um microscópio confocal Zeiss LSM 880 invertido presente no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI- ICB). Todas as marcações foram quantificadas usando Fiji Software ®.

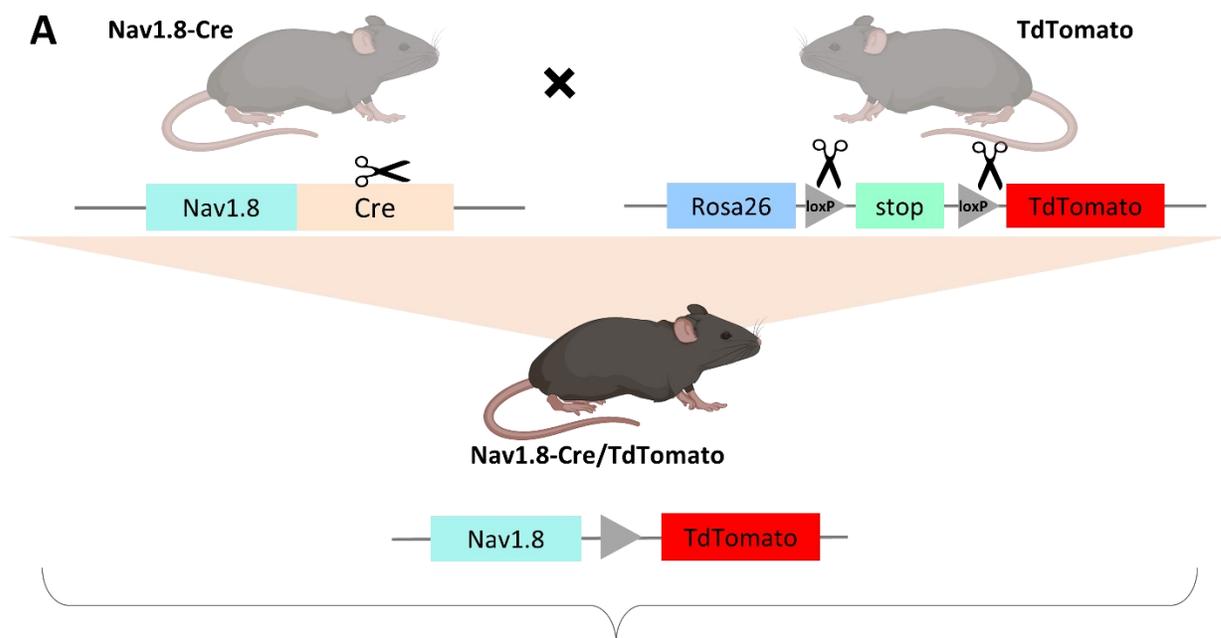
- ***Análise estatística***

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste T e dados não-paramétricos pelo teste de Mann Whitney. Em todos os casos, consideramos  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo e exibimos a média  $\pm$  erro padrão.

## 6. RESULTADOS

- *Os neurônios sensoriais Nav1.8<sup>+</sup> estão presentes no microambiente tumoral da mama*

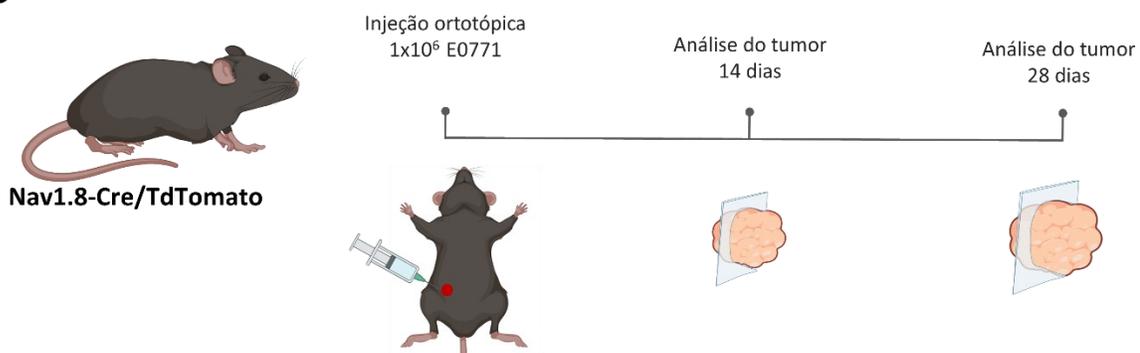
Para examinar se os neurônios sensoriais estão presentes no microambiente tumoral da mama, foi utilizado um modelo de camundongo com tumor de mama ortotópico, no qual apenas os neurônios sensoriais são marcados com o fluoróforo vermelho TdTomato. Em camundongos Nav1.8-Cre/TdTomato, após a remoção do cassete loxP-stop-loxP por ação da recombinase Cre, o TdTomato é expresso apenas em neurônios sensoriais Nav1.8<sup>+</sup> (Figura 9 - A). Esses animais receberam a injeção das células E0771 no quarto coxim de tecido adiposo mamário e o tumor foi analisado em dois momentos de seu desenvolvimento (Figura 9 - B). Conforme avaliado por microscopia de fluorescência a expressão endógena de TdTomato, os neurônios sensoriais estão presentes no microambiente tumoral mamário, tanto no início de seu desenvolvimento, aos 14 dias (Figura 9 - C), quanto em uma etapa mais avançada de seu desenvolvimento, aos 28 dias (Figura 9 - D). A inervação sensorial foi encontrada tanto em regiões periféricas (conforme ilustrado na Figura 9 - C) quanto em regiões mais centrais do tumor (conforme ilustrado na Figura 9 - D).



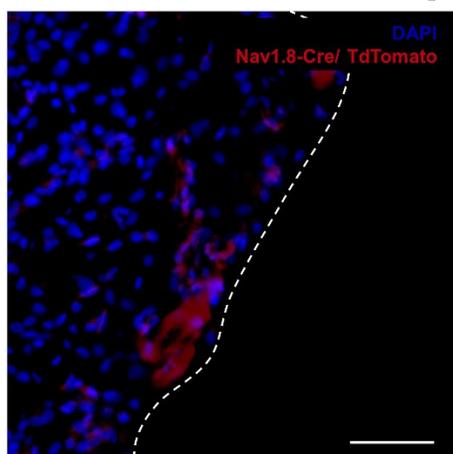
Neurônios sensoriais (Nav1.8+)    Outras células



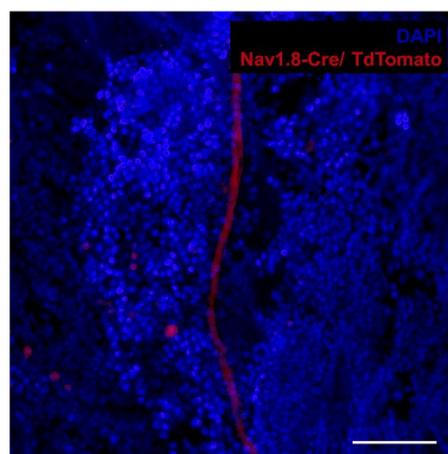
**B**



**C**



**D**

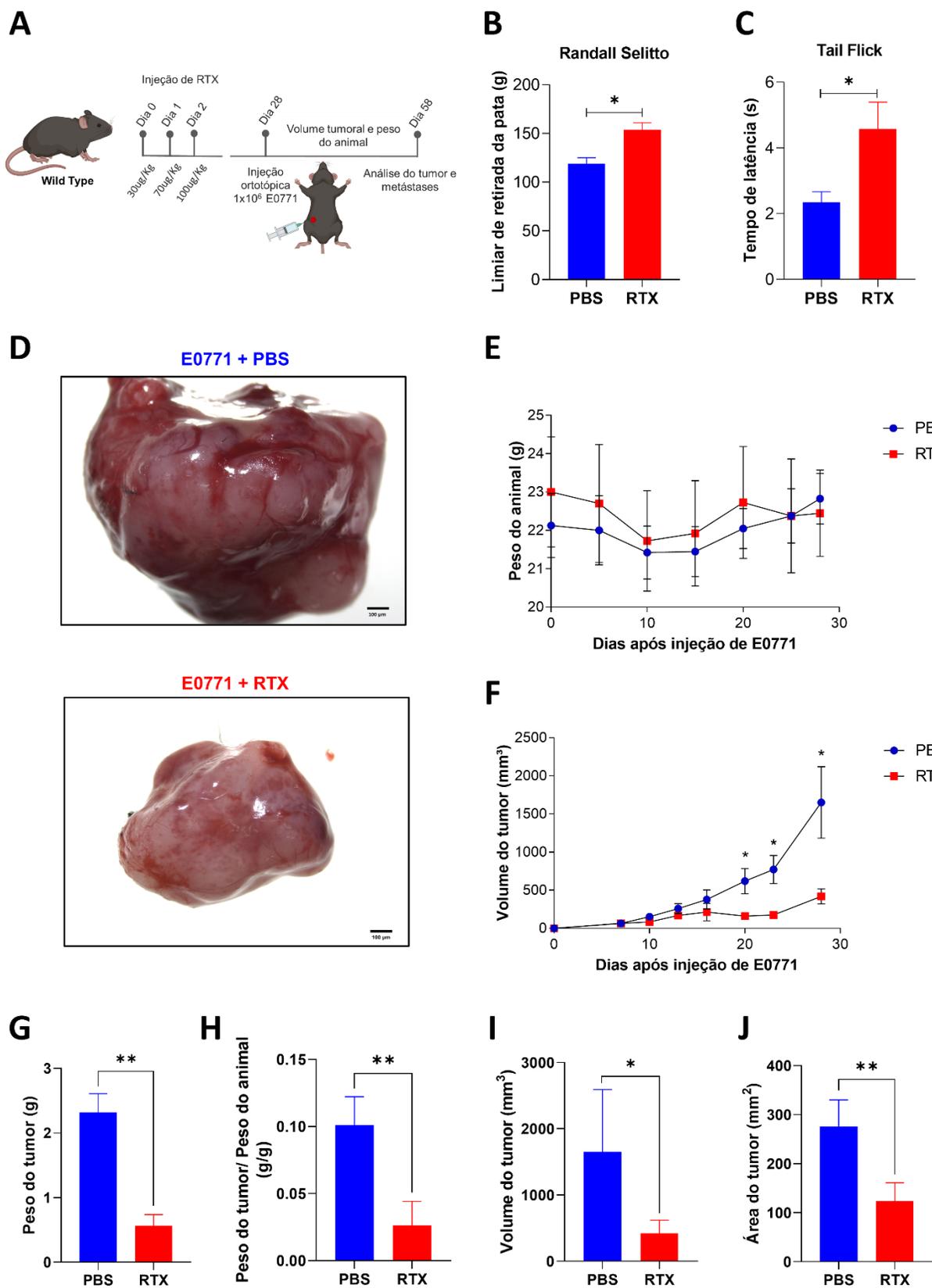


**Figura 9. Os neurônios sensoriais Nav1.8+ estão presentes no microambiente tumoral da mama.**

**A.** Representação esquemática do cruzamento entre os camundongos Nav1.8-Cre e camundongos B6.TdTomato para gerar os animais experimentais Nav1.8-Cre/TdTomato, os quais possuíam os nervos sensoriais marcados em vermelho. **B.** Representação do protocolo para crescimento ortotópico do tumor de mama. Camundongos fêmeas Nav1.8-Cre/TdTomato receberam a injeção de  $1 \times 10^6$  células E0771 no coxim adiposo da 4ª glândula mamária. As eutanásias e análises do tumor foram realizadas em dois diferentes momentos do desenvolvimento tumoral, 14 dias ( $n = 4$ ) e 28 dias ( $n = 4$ ) após a injeção das células. **C.** Imagem por microscopia confocal mostrando a inervação sensorial em fluorescência vermelha em tumores primários no 14º dia após a injeção. A linha tracejada indica a borda tumoral. **D.** Imagem por microscopia confocal mostrando a inervação sensorial em fluorescência vermelha em tumores primários no 28º dia após a injeção. Imagens com aumento de 40x. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

- ***A depleção química dos neurônios sensoriais inibe o desenvolvimento tumoral***

A fim de identificar o papel dos neurônios sensoriais no desenvolvimento do tumor de mama E0771, foi realizada a depleção química dos neurônios sensoriais através do tratamento com resiniferatoxina (RTX). Camundongos do tipo selvagem (WT) foram pré-tratados com 3 doses consecutivas de RTX (30, 70 e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou veículo (PBS), aguardou-se um período de recuperação do tratamento de 28 dias, seguido do transplante das células de câncer de mama. Ao longo dos 28 dias seguintes, os animais foram observados, seus tumores foram medidos com paquímetro, e seu peso corporal foi medido (Figura 10 - A). A eficiência da depleção foi confirmada por testes comportamentais para medir as respostas mecânicas (Figura 10 - B) e térmicas (Figura 10 - C). Os animais depletados suportaram mais peso antes da retirada da pata (de  $119,0 \pm 1,93$  para  $153,6 \pm 2,85$  g) e também tiveram um tempo aumentado para exibir o reflexo de retirada da cauda em contato com o calor elevado (de  $2,34 \pm 0,10$  para  $4,58 \pm 0,31$  s), o que significa que o limiar da resposta nociceptiva foi elevado nestes animais, confirmando a depleção. O pré-tratamento com RTX, e consequente depleção dos neurônios sensoriais, diminuiu o crescimento do tumor de mama (Figura 10 - D). O peso do tumor diminuiu de  $2,32 \pm 0,29$  para  $0,56 \pm 0,17$  g; o peso do tumor por peso corporal diminuiu de  $0,10 \pm 0,01$  para  $0,03 \pm 0,01$  g; o volume do tumor diminuiu de  $1651,85 \pm 470,4$  para  $420,25 \pm 98,67$   $\text{mm}^3$ ; a área do tumor diminuiu de  $276,20 \pm 27,00$  para  $124,17 \pm 18,45$   $\text{mm}^2$  (Figura 10 - G - J). O peso dos animais, ao decorrer do experimento, não foi afetado pela depleção química dos neurônios sensoriais (Figura 10 - E). O volume tumoral, medido através de um paquímetro, foi menor em animais depletados para os neurônios sensoriais a partir do 20º dia após a aplicação das células (reduziu de  $620,04 \pm 165,8$  para  $160,90 \pm 40,21$   $\text{mm}^3$ ) (Figura 10 - F). Esses resultados indicam que os nervos sensoriais do microambiente tumoral estão estimulando a progressão do câncer de mama.

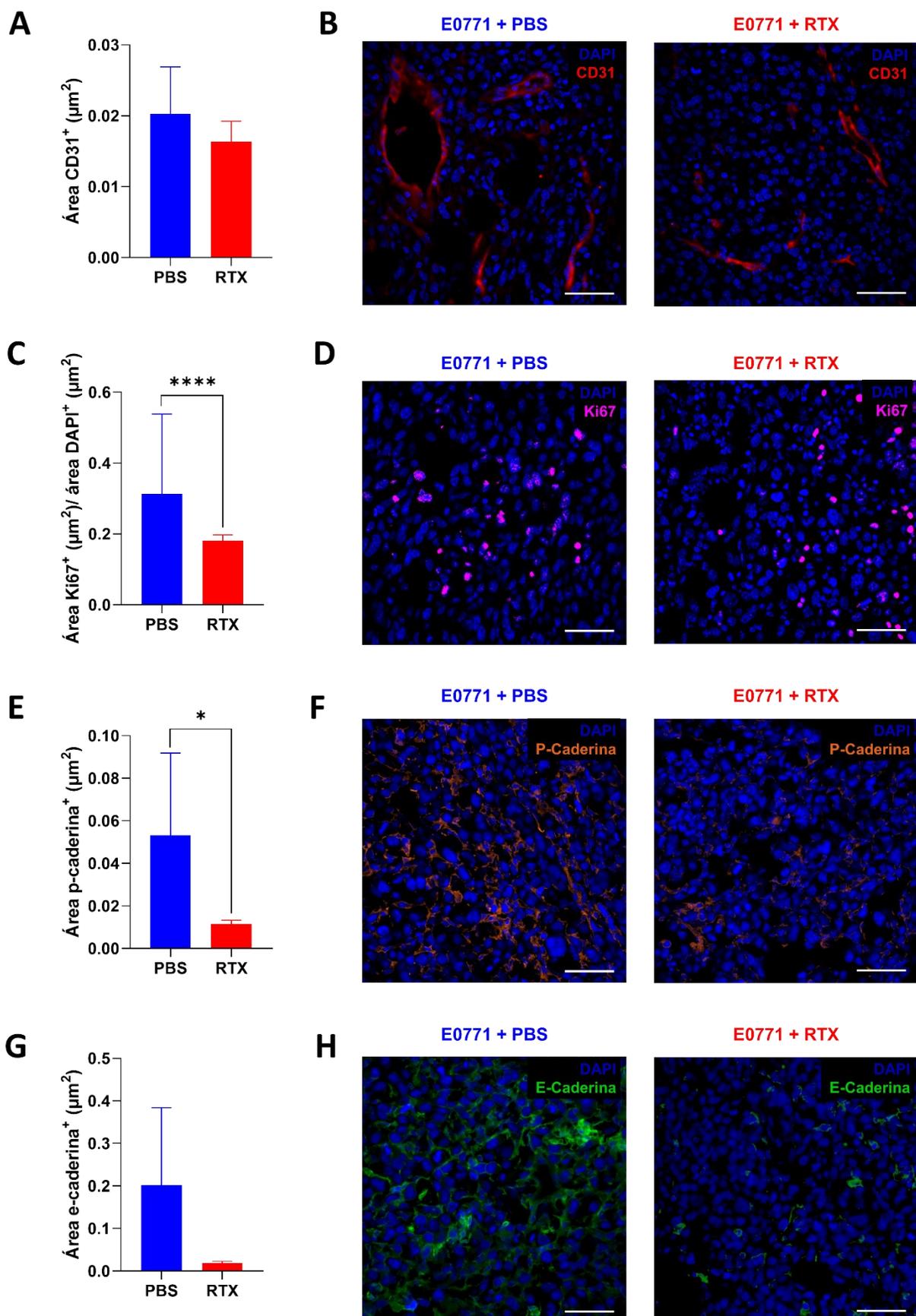


**Figura 10. A depleção química dos neurônios sensoriais inibe o desenvolvimento tumoral.**

**A.** Representação esquemática para a depleção química dos neurônios sensoriais mediada por RTX e crescimento ortotópico do tumor mamário E0771. Camundongos WT foram injetados diariamente com doses crescentes de RTX (WT + RTX; n = 4; 30, 70 e 100 µg/kg) ou veículo (WT + Veículo; n = 4). Os camundongos descansaram por 28 dias antes da injeção ortotópica de  $1 \times 10^6$  células E0771. Os tumores foram removidos após 28 dias. **B.** Quantificação do teste de Randall Selitto para determinar o limiar de retirada da pata (WT + PBS:  $119,0 \pm 1,93$  g; WT + RTX:  $153,6 \pm 2,85$  g) . **C.** Quantificação do teste Tail Flick para determinar o tempo de latência (WT + PBS:  $2,34 \pm 0,10$  s; WT + RTX:  $4,58 \pm 0,31$  s) **D.** Imagens macroscópicas representativas de tumores de mama E0771 após dissecação, painel superior (WT + PBS) e painel inferior (WT + RTX). **E.** Peso dos animais ao longo dos 28 dias após a injeção das células. **F.** Volume tumoral medido com paquímetro ao longo dos 28 dias após a injeção das células. **G.** Peso do tumor (WT + PBS:  $2,32 \pm 0,29$  g; WT + RTX:  $0,56 \pm 0,17$  g). **H.** Peso do tumor corrigido pelo peso corporal do animal (WT + PBS:  $0,10 \pm 0,01$  g; WT + RTX:  $0,03 \pm 0,01$  g). **I.** Volume do tumor (WT + PBS:  $1651,85 \pm 470,4$  mm<sup>3</sup>; WT + RTX:  $420,25 \pm 98,67$  mm<sup>3</sup>). **J.** Área do tumor (WT + PBS:  $276,20 \pm 27,00$  mm<sup>2</sup>; WT + RTX:  $124,17 \pm 18,45$  mm<sup>2</sup>). Análise estatística: Teste T; \*\*p<0,001 e \*p <0.05. n = 4 camundongos para todos os grupos. Os dados são apresentados como média ± erro padrão. Imagens com aumento de 0,67x. Barras de escala, 100 µm.

- ***A depleção química dos neurônios sensoriais altera a angiogênese, proliferação celular e a expressão de glicoproteínas de membrana***

A depleção dos neurônios sensoriais mostrou induzir uma tendência a redução da área dos vasos intra-tumorais (de  $0,02 \pm 0,01$  para  $0,01 \pm 0,00 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 11 – A e B). Além disso, também foi observada uma redução na proliferação de células dentro do tumor (de  $0,31 \pm 0,23$  para  $0,18 \pm 0,02 \mu\text{m}^2 / \mu\text{m}^2$  DAPI+) (Figura 11 – C e D). A expressão das caderinas clássicas, P-caderina (Figura 11 – E e F) e E-Caderina (Figura 11 – G e H), também foi reduzida na ausência dos neurônios sensoriais (de  $0,05 \pm 0,04$  para  $0,01 \pm 0,00$  e  $0,20 \pm 0,18$  para  $0,02 \pm 0,00$  respectivamente). Juntos, esses resultados apoiam a ideia de que a depleção química dos neurônios sensoriais inibe a progressão do tumor de mama E0771, apresentando uma tendência na redução dos vasos sanguíneos dentro do tumor e diminuindo, significativamente, a proliferação celular. A redução da expressão de E-caderina e P-caderina vem em contradição a esse fenótipo tumoral menos agressivo.

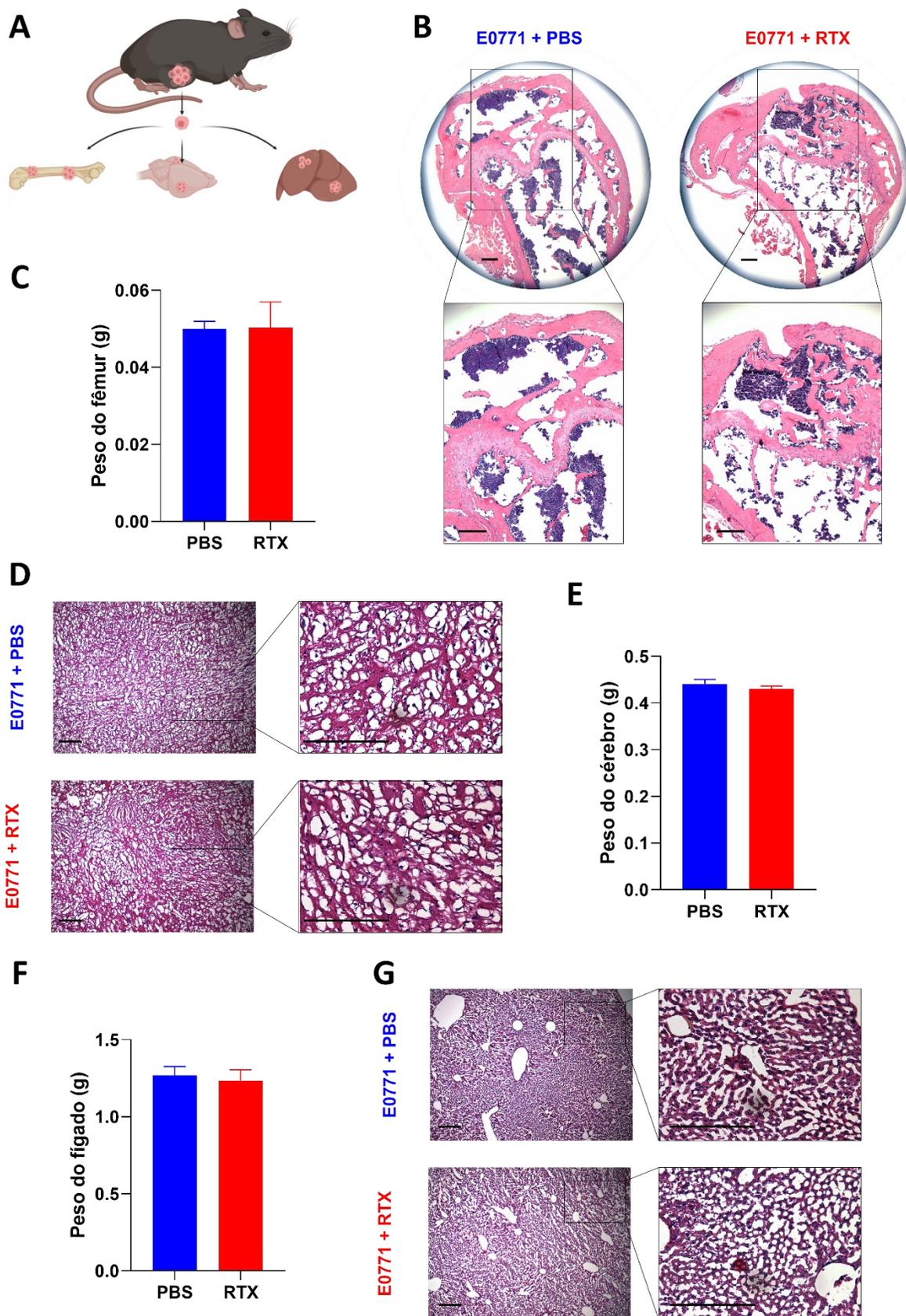


**Figura 11. A depleção química dos neurônios sensoriais altera a angiogênese, proliferação celular e a expressão de glicoproteínas de membrana.**

**A.** Quantificação das áreas positivas para a marcação de CD31 e determinação da angiogênese intratumoral. **B.** Imagens representativas de imunofluorescência de secções tumorais de camundongos, depletados ou não para neurônios sensoriais, marcados para células endoteliais (CD31; vermelho) para identificação de vasos sanguíneos e núcleo (DAPI; azul). **C.** Quantificação das áreas positivas para Ki67 por áreas positivas para DAPI e determinação da proliferação celular intratumoral. **D.** Imagens de imunofluorescência representativas de secções de tumores de mama de camundongos, depletados ou não para neurônios sensoriais, para identificar a proliferação celular (Ki67; magenta) e núcleos (DAPI; azul). **E.** Quantificação das áreas positivas para expressão de P-caderina intratumoral. **F.** Imagens de imunofluorescência representativas de secções de tumores de mama de camundongos, depletados ou não para neurônios sensoriais, para identificar a expressão de P-caderina (P-caderina; laranja) e núcleos (DAPI; azul). **G.** Quantificação das áreas positivas para expressão de E-caderina intratumoral. **H.** Imagens de imunofluorescência representativas de secções de tumores de mama de camundongos, depletados ou não para neurônios sensoriais, para identificar a expressão de E-caderina (E-caderina; verde) e núcleos (DAPI; azul). Análise estatística: Teste T; \*\*\*\* $p < 0,0001$  e \* $p < 0,05$ .  $n = 4$  camundongos para todos os grupos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Imagens com aumento de 40x. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

- ***A ausência de inervação sensorial não interfere no surgimento de metástases espontâneas hepáticas, cerebrais e femorais***

A linhagem de células tumorais mamárias E0771 já foi descrita como sendo capaz de gerar metástases espontâneas, a partir de determinado momento do desenvolvimento tumoral. Entretanto, alguns autores divergem em relação aos sítios metastáticos preferenciais para essa linhagem. Através da coloração histológica Hematoxilina e Eosina (HE), foram analisadas secções dos fêmures bilaterais desses animais, do cérebro e do fígado, e não foram encontradas lesões metastáticas nestes tecidos, independentemente da presença dos neurônios sensoriais (Figura 12 – B, D e G). Todos esses tecidos também foram pesados e não apresentaram diferenças significativas quando comparados os dois grupos, PBS e RTX (Figura 12 – C, E e F).

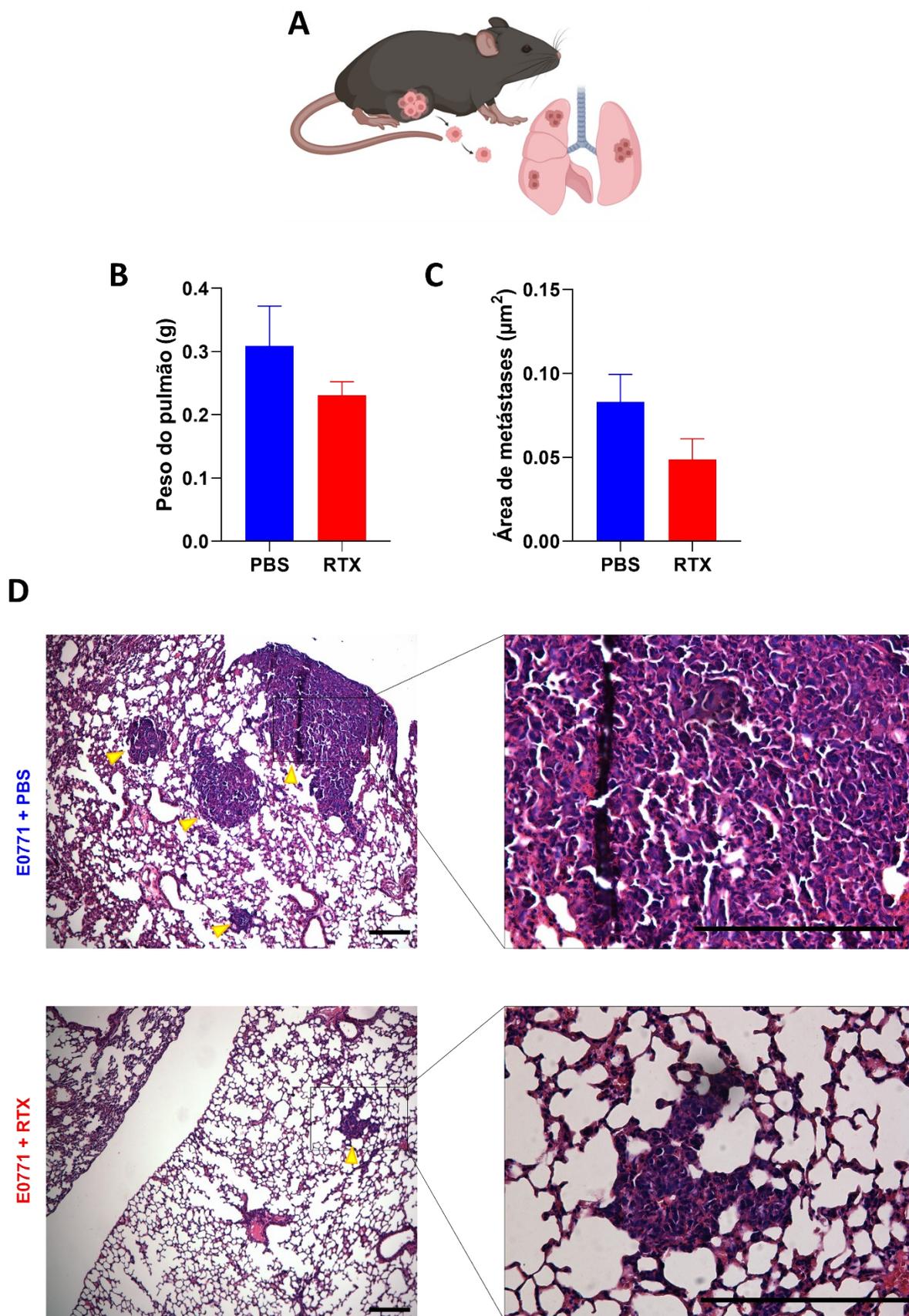


**Figura 12. A ausência de inervação sensorial não interfere no surgimento de metástases espontâneas hepáticas, cerebrais e femorais.**

**A.** Possíveis sítios metastáticos das células E0771. **B.** Fotomicrografia de lâminas de fêmur em aumento de 4x e 10x, coradas com HE mostrando tecido ósseo com aspecto característico. **C.** Análise do peso dos fêmures dos animais (WT + PBS:  $0,05 \pm 0,00$  g; WT + RTX:  $0,05 \pm 0,00$  g). **D.** Fotomicrografia de lâminas de cérebro em aumento de 10x e 40x, coradas com HE mostrando tecido cerebral com aspecto característico. **E.** Análise do peso dos cérebros dos animais (WT + PBS:  $0,44 \pm 0,01$  g; WT + RTX:  $0,43 \pm 0,01$  g). **F.** Análise do peso dos fígados dos animais (WT + PBS:  $1,27 \pm 0,06$  g; WT + RTX:  $1,25 \pm 0,07$  g). **G.** Fotomicrografia de lâminas de fígado em aumento de 10x e 40x coradas com HE mostrando tecido hepático com aspecto característico. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Barras de escala, 400  $\mu$ m (Figura B) e 200  $\mu$ m (Figuras D e G).

- ***A ausência de inervação reduz as metástases espontâneas pulmonares***

A migração espontânea das células E0771 para os pulmões é mais comumente descrita (Figura 13 – A). Após a depleção química dos neurônios sensoriais, os pulmões dos animais foram analisados. Os grupos não apresentaram diferença estatística em relação ao peso dos pulmões, apenas uma tendência à redução após a depleção sensorial e inoculação das células E0771 (de  $0,31 \pm 0,06$  para  $0,23 \pm 0,02$  g) (Figura 13 - B). Após análise histológica desses tecidos, corados com Hematoxilina & Eosina, foram observadas metástases distribuídas pelo órgão, tanto dos animais depletados para os neurônios sensoriais, quanto dos animais-controle (Fig. 13 - D). Os pulmões dos animais depletados para os neurônios sensoriais apresentaram uma área metastática reduzida em comparação com os animais-controle (de  $0,08 \pm 0,02$  para  $0,05 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 13 -C).



**Figura 13. A ausência de inervação reduz as metástases espontâneas pulmonares.**

**A.** Representação da migração de células tumorais da mama para formar metástases pulmonares. **B.** Análise do peso dos pulmões dos animais (WT + PBS:  $0,31 \pm 0,06$  g; WT + RTX:  $0,23 \pm 0,02$  g). **C.** Quantificação da área de metástases pulmonares em animais controle ou depletados para neurônios sensoriais (WT + PBS:  $0,08 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$  ; WT + RTX:  $0,05 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ ). **D.** Fotomicrografia de lâminas de pulmão, em aumento de 10x e 40x, coradas com HE mostrando metástases pulmonares de tumores de mama E0771, em animais com os neurônios sensoriais preservados (parte superior) e em animais cujos nervos sensoriais foram depletados (parte inferior). As pontas de setas amarelas indicam lesões metastáticas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Barras de escala 200  $\mu\text{m}$ .

## 7. DISCUSSÃO

Nesse estudo, demonstramos que os neurônios sensoriais Nav1.8<sup>+</sup> estão presentes no microambiente tumoral da mama e que a depleção dessas células altera o desenvolvimento desse tumor. Nossos resultados revelam que a denervação sensorial reduz o crescimento tumoral, a formação de vasos sanguíneos e a proliferação celular nesse microambiente. A expressão de E-caderina e P-caderina, pertencentes à família das caderinas clássicas, também é reduzida, bem como a disseminação metastática pulmonar.

O microambiente tumoral da mama é extremamente complexo e heterogêneo, composto não apenas pelas células tumorais, mas também por células imunes, fibroblastos, adipócitos, vasos sanguíneos, componentes da matriz extracelular e fatores secretados por todos esses elementos (ANDERSON; SIMON, 2020). Dentre esses integrantes, o tumor também conta com a presença de fibras nervosas (HUANG; SU; CUI; SHEN *et al.*, 2014). Nossos dados mostram que neurônios sensoriais identificados pela expressão do canal de sódio Nav1.8 estão presentes no tumor mamário murino de células E0771. A inervação sensorial foi identificada tanto no momento inicial do desenvolvimento tumoral, aos 14 dias, quanto em um momento mais tardio, aos 28 dias.

Em outros modelos de câncer de mama murino, como, por exemplo, nos tumores advindos da inoculação de células MDA-MB-231, foi possível detectar um aumento de fibras nociceptoras positivas para CGRP dentro do tumor, em comparação ao tecido mamário saudável (AUSTIN; ELLIOTT; NICOLAOU; GRABOWSKA *et al.*, 2017).

Em humanos, tumores primários de mama também são infiltrados por fibras nervosas PGP9.5<sup>+</sup>, que estavam amplamente distribuídas nesse microambiente, em contato com células cancerosas, adipócitos, arteríolas e vasos sanguíneos (PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015).

Os neurônios sensoriais também podem ser encontrados em outros tipos de tumor, como, por exemplo, o adenocarcinoma ductal pancreático (SALOMAN; ALBERS; LI; HARTMAN *et al.*, 2016) e, assim como demonstrado por nosso grupo, no microambiente de melanomas em um

modelo de xenoinxerto de células B16F10 aos 16 dias de desenvolvimento tumoral (PRAZERES; LEONEL; SILVA; ROCHA *et al.*, 2020).

Dentro do tumor, as interações celulares ditam a sua progressão e cada elemento desse microambiente pode contribuir de forma diferente para o desenvolvimento da doença (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Dentre os elementos que ainda precisam ter sua identidade e papéis estabelecidos, nossos resultados demonstraram que a inervação sensorial é um constituinte chave, alterando o desenvolvimento do tumor mamário. A depleção química dos neurônios sensoriais, através do tratamento com RTX, e posterior inoculação das células E0771, levou a uma redução do crescimento do tumor primário ao final de 28 dias.

A denervação, seja ela química, cirúrgica ou genética, encerra a comunicação entre o SNC e o SNP, permitindo, dessa forma, investigar o efeito da inervação em um tecido específico (ZAHALKA; FRENETTE, 2020).

Erin e colaboradores (2004 e 2008), inoculando células de câncer de mama 4T1 e utilizando métodos diferentes de denervação sensorial, demonstraram que o crescimento do tumor primário no coxim adiposo mamário não foi afetado pela ausência dos neurônios sensoriais (ERIN; AKDAS BARKAN; HARMS; CLAWSON, 2008; ERIN; BOYER; BONNEAU; CLAWSON *et al.*, 2004).

Após um modelo de denervação sensorial cirúrgica e implantação ortotópica de linhagens de células de câncer de mama humano, Kappos e colaboradores (2018) observaram, por ressonância magnética, uma redução dos volumes tumorais em 76% das ratas (KAPPOS; ENGELS; TREMP; SIEBER *et al.*, 2018).

Desvendar as interações celulares estabelecidas com os neurônios sensoriais dentro do microambiente tumoral pode ser o prelúdio para estabelecer o papel dessas células para a progressão do tumor. Em um estudo anterior publicado por nosso grupo, discutimos a relação existente entre esse componente do SNP e a resposta imune no microambiente tumoral do melanoma (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021). Utilizando modelos quimiogénéticos de ativação e inibição específica dos neurônios sensoriais, Costa e colaboradores (2021) foram capazes de comprovar, de maneira elegante, que a excitação dos neurônios sensoriais induz à regressão do melanoma e o aumento da vigilância imunológica antitumoral, aumentando os linfócitos antitumorais infiltrantes, enquanto reduzia as células imunossupressoras (COSTA;

SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021). Mesmo que a modulação do componente sensorial no melanoma leve a uma resposta oposta à revelada por nossos dados no microambiente tumoral da mama, a comunicação com as células imunes é um caminho potencial para explicar a atuação dos neurônios sensoriais.

Além da inervação sensorial, a inervação autônoma está presente no microambiente de diversos tumores e sua função vem sendo descrita, na maioria das vezes, como pró-tumorigênica. Em modelos de câncer de próstata, o sistema nervoso simpático foi crítico nas fases iniciais do desenvolvimento tumoral e as fibras parassimpáticas tiveram seu papel relacionado à disseminação metastática (MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013). No câncer gástrico, houve uma redução na progressão tumoral e um aumento na eficácia da quimioterapia após a vagotomia cirúrgica (ZHAO; HAYAKAWA; KODAMA; MUTHUPALANI *et al.*, 2014).

No tumor mamário, a estimulação genética de fibras simpáticas foi responsável por acelerar o crescimento e a progressão do tumor, enquanto a estimulação parassimpática levou ao efeito contrário. A denervação simpática suprimiu o crescimento tumoral e a expressão de moléculas de *checkpoint* imunológico no microambiente de xenoinxertos de câncer de mama humano em camundongos (KAMIYA; HAYAMA; KATO; SHIMOMURA *et al.*, 2019).

Devido às possíveis ligações entre os componentes do SNP (CHEN; HU; LV; ZHU *et al.*, 2019; HU; LV; CHEN; XUE *et al.*, 2020), torna-se relevante avaliar a existência de uma comunicação sensorial e autônoma dentro do microambiente tumoral e se, na ausência de um desses componentes, o outro desencadeia uma resposta diferente, podendo ser pró ou antitumoral.

Os tumores sólidos dependem da formação de novos vasos para sustentar seu crescimento (FOLKMAN; WATSON; INGBER; HANAHAN, 1989; RIGHI; LOCATELLI; CARLOSTELLA; PRESTA *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstraram que a denervação química dos neurônios sensoriais inibiu a formação de vasos intratumorais.

Estes dois elementos, vasos e nervos sensoriais, compartilham ferramentas e estratégias moleculares durante a sua formação e ramificação (CARMELIET, 2003; EICHMANN; LE NOBLE; AUTIERO; CARMELIET, 2005), mas a existência de uma comunicação dentro do tumor mamário ainda não foi estabelecida.

Zhao e colaboradores deram o primeiro passo para embasar essa discussão, correlacionando a alta expressão de PGP9.5 com o aumento da densidade de microvasos em tumores de mama negativos para expressão de RE (ZHAO; YANG; LIANG; DU *et al.*, 2014).

Em outros microambientes, como por exemplo o da córnea, o CGRP, derivado de neurônios sensoriais, foi relacionado à promoção de neovascularização, estando diretamente ligado à etapas importantes desse processo, como, por exemplo, a proliferação de células endoteliais vasculares (ZHU; ZIDAN; PANG; MUSAYEVA *et al.*, 2022). A partir disso, será interessante descobrir quais moléculas sinalizadoras e quais outros elementos são responsáveis por esse fenótipo no microambiente tumoral.

Dentre os eventos responsáveis pela progressão do câncer, a TEM tem papel importante. O processo de TEM é caracterizado por uma mudança fenotípica das células, onde ocorre a perda progressiva das características epiteliais e aquisição de características mesenquimais (RIBEIRO; PAREDES, 2014). No tumor, essa mudança pode estar relacionada ao desenvolvimento de células de câncer quimiorresistentes, com propriedades de células tronco e capazes de escapar da ação das células imunes, além de adquirirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes, resistir à apoptose e metastatizar (TRYNDYAK; BELAND; POGRIBNY, 2010).

A perda de E-caderina é um evento particularmente comum para este tipo de tumor de mama, já que confere à célula um fenótipo migratório e invasivo (SOUSA; PEREIRA; PAREDES, 2019), além disso, Ribeiro e Paredes (2014) defendem que, células de câncer de mama Triplo-Negativo tipo basal perdem a expressão de P-caderina quando atingem o fenótipo mesenquimal (RIBEIRO; PAREDES, 2014). Desta forma, os resultados encontrados após depleção farmacológica utilizando RTX podem indicar uma possível alteração no fenótipo tumoral, tornando-se fulcral a análise de marcadores mesenquimais clássicos como Fibronectina, Vimentina e N-caderina. Somente assim saberemos se a depleção dos nervos sensoriais promoveu alguma alteração na composição celular dos tumores mamários.

Considerando o potencial metastático das células E0771, avaliamos quatro dos principais tecidos dos quais as células tumorais mamárias apresentam maior tropismo: pulmões, fêmures, fígado e cérebro (LE NAOUR; ROSSARY; VASSON, 2020).

Após análise histológica por coloração com hematoxilina e eosina, não foram encontradas lesões metastáticas no cérebro, fígado ou fêmures dos animais inoculados com as células de câncer de mama, independentemente da presença dos neurônios sensoriais. Estudos anteriores em que se utilizou modelos de indução de metástases, tumores mamários secundários foram encontrados nesses e em outros órgãos após inoculação das células E0771 (CHEN; ZHENG; YU; LIU *et al.*, 2020; CONTRERAS-ZÁRATE; DAY; ORMOND; BORGES *et al.*, 2019; HIRAGA; NINOMIYA, 2019). Dessa forma, a capacidade de formação dessas lesões secundárias por essa linhagem celular parece não acontecer de maneira espontânea para todos os tecidos.

Em relação à análise histológica dos pulmões, nossos resultados mostram que a injeção ortotópica das células E0771 foi capaz de gerar metástases pulmonares espontâneas e que a presença dessas lesões foi alterada pela ausência dos neurônios sensoriais.

Corroborando nossos achados e a caracterização de um modelo metastático espontâneo, trabalhos anteriores também detectaram metástases pulmonares após 28 dias da inoculação das células E0771, tanto através de injeção subcutânea, quanto de injeção ortotópica, no coxim de tecido adiposo mamário de camundongos fêmea (EWENS; MIHICH; EHRKE, 2005; KASIKARA; DAVRA; CALIANESE; GENG *et al.*, 2019).

Nossos dados mostraram que a denervação sensorial levou a uma redução da área metastática nos pulmões. Resultados opostos foram encontrados por Erin e colaboradores (2004), que constataram um aumento das metástases pulmonares e cardíacas de tumores mamários de células 4T1 após a inativação dos neurônios sensoriais através do tratamento com altas doses de capsaicina. (ERIN; BOYER; BONNEAU; CLAWSON *et al.*, 2004).

Assim sendo, o papel dos neurônios sensoriais e de seus neurotransmissores no desenvolvimento de metástases permanece controverso, entretanto, dentre as teorias postuladas atualmente para explicar o desenvolvimento de metástases tumorais. O “modelo epigenético” pode fomentar essa discussão. Ele se baseia no fato de que substâncias sinalizadoras, como quimiocinas, prostaglandinas e neurotransmissores tem a capacidade de ativar um fenótipo metastático nas células tumorais (DRELL; JOSEPH; LANG; NIGGEMANN *et al.*, 2003).

Assim como demonstrado em experimentos com culturas celulares de carcinoma de mama humano, alguns neurotransmissores, incluindo a substância P secretada por neurônios sensoriais,

podem estar envolvidos na estimulação da migração de células tumorais, etapa fundamental da cascata metastática (DRELL; JOSEPH; LANG; NIGGEMANN *et al.*, 2003).

A explicação da migração direcionada para tecidos específicos ainda permanece em aberto, mas a teoria da “quimioatração” pode se apresentar como direção futura para novos experimentos. Nessa teoria, moléculas atrativas específicas de alguns tecidos atingem a circulação e estimulam células tumorais migratórias a invadir os vasos sanguíneos e entrar nos órgãos (LIOTTA, 2001).

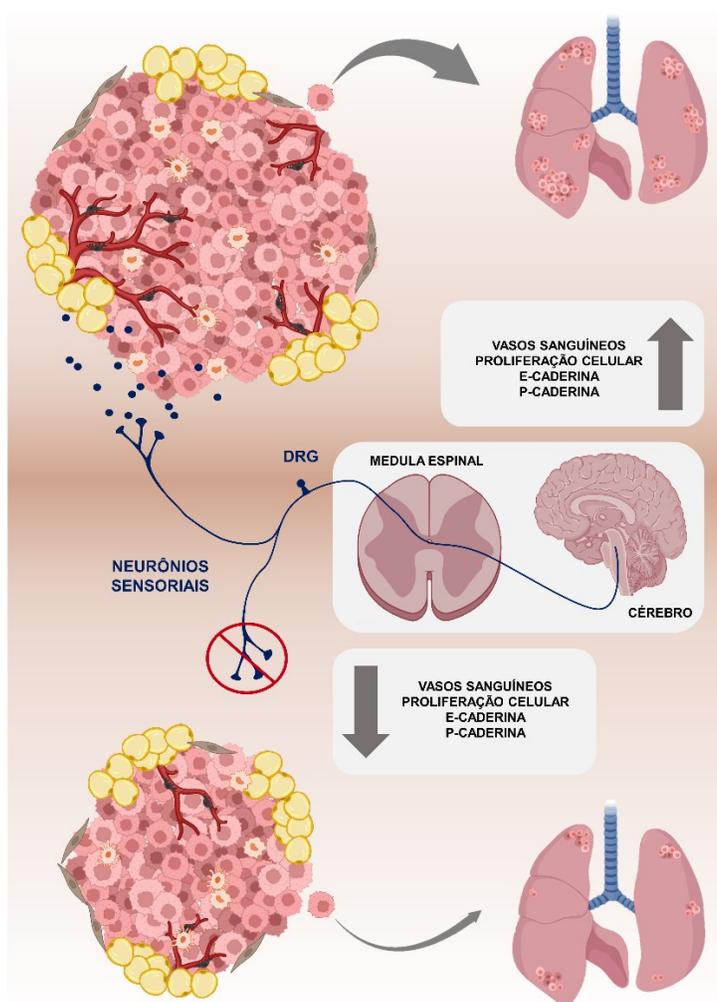
Em tecidos de pacientes com câncer de mama, foram encontrados um par receptor-quimiocina (receptor CXCR4 e quimiocina CXCL12) que se encaixa na teoria da quimioatração, em que o receptor foi altamente expresso no tecido tumoral e a quimiocina expressa em muitos órgãos, incluindo os pulmões, onde frequentemente são encontradas metástases de câncer de mama (MÜLLER, ANJA; HOMEY, BERNHARD; SOTO, HORTENSIA; GE, NIANFENG *et al.*, 2001).

Apesar dos direcionamentos fornecidos por nossos resultados, várias questões ainda precisam ser respondidas em relação à inervação sensorial como componente importante do microambiente tumoral da mama. Pesquisas futuras podem direcionar seus esforços para entender como o tumor recruta esse componente do SNP e de que forma são estabelecidas as interações celulares com esses neurônios.

Dentre os desafios ainda por vir, estabelecer um valor translacional dessas descobertas para aplicação em pacientes, parece ser o maior deles. A inervação sensorial pode ser explorada não apenas como um biomarcador, mas como alvo terapêutico potencial para o tratamento do câncer de mama, e, para que esta projeção se concretize, é necessário que sejam realizadas investigações experimentais complementares.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem que os neurônios sensoriais são um elemento relevante do microambiente tumoral da mama e que a depleção química dessas células leva a uma regressão do tumor e da formação de metástases pulmonares. Dessa forma, encontrar maneiras de bloquear a inervação sensorial em pacientes com câncer, pode ser uma alternativa promissora para a terapia antitumoral.



**Figura 14. Ilustração esquemática resumindo os resultados da denervação sensorial no microambiente tumoral da mama.**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAENSSENS, E.; VANHECKE, E.; SAULE, P.; MOUGEL, A. *et al.* Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. **Cancer Res**, 68, n. 2, p. 346-351, Jan 15 2008.

AKOPIAN, A. N.; SIVILOTTI, L.; WOOD, J. N. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. **Nature**, 379, n. 6562, p. 257-262, Jan 18 1996.

ALBO, D.; AKAY, C. L.; MARSHALL, C. L.; WILKS, J. A. *et al.* Neurogenesis in colorectal cancer is a marker of aggressive tumor behavior and poor outcomes. **Cancer**, 117, n. 21, p. 4834-4845, Nov 1 2011.

ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Curr Biol**, 30, n. 16, p. R921-r925, Aug 17 2020.

AUSTIN, M.; ELLIOTT, L.; NICOLAOU, N.; GRABOWSKA, A. *et al.* Breast cancer induced nociceptor aberrant growth and collateral sensory axonal branching. **Oncotarget**, 8, n. 44, p. 76606-76621, Sep 29 2017.

AYALA, G. E.; DAI, H.; POWELL, M.; LI, R. *et al.* Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. **Clin Cancer Res**, 14, n. 23, p. 7593-7603, Dec 1 2008.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **J Cell Sci**, 125, n. Pt 23, p. 5591-5596, Dec 1 2012.

BAPAT, A. A.; HOSTETTER, G.; VON HOFF, D. D.; HAN, H. Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. **Nat Rev Cancer**, 11, n. 10, p. 695-707, Sep 23 2011.

BARAL, P.; UMANS, B. D.; LI, L.; WALLRAPP, A. *et al.* Nociceptor sensory neurons suppress neutrophil and  $\gamma\delta$  T cell responses in bacterial lung infections and lethal pneumonia. **Nat Med**, 24, n. 4, p. 417-426, May 2018.

BASSUKAS, I. D.; MAURER-SCHULTZE, B. Relationship between preimplantation host weight and growth of the mouse adenocarcinoma EO 771. **In Vivo**, 6, n. 1, p. 93-96, Jan-Feb 1992.

BELL, C. D.; WAIZBARD, E. Variability of cell size in primary and metastatic human breast carcinoma. **Invasion Metastasis**, 6, n. 1, p. 11-20, 1986.

BOMBONATI, A.; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **J Pathol**, 223, n. 2, p. 307-317, Jan 2011.

BOOTH, L. C.; MAY, C. N.; YAO, S. T. J. F. i. p. The role of the renal afferent and efferent nerve fibers in heart failure. 6, p. 270, 2015.

CAMERLINGO, M.; NEMNI, R.; FERRARO, B.; CASTO, L. *et al.* Malignancy and sensory neuropathy of unexplained cause: a prospective study of 51 patients. **Arch Neurol**, 55, n. 7, p. 981-984, Jul 1998.

CARMELIET, P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. **Nat Rev Genet**, 4, n. 9, p. 710-720, Sep 2003.

CARRIEL, V.; GARZÓN, I.; ALAMINOS, M.; CORNELISSEN, M. Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. **Neural Regen Res**, 9, n. 18, p. 1657-1660, Sep 15 2014.

CATALA, M.; KUBIS, N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. **Handb Clin Neurol**, 115, p. 29-41, 2013.

CEYHAN, G. O.; DEMIR, I. E.; ALTINTAS, B.; RAUCH, U. *et al.* Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 374, n. 3, p. 442-447, Sep 26 2008.

CHEN, H.; HU, B.; LV, X.; ZHU, S. *et al.* Prostaglandin E2 mediates sensory nerve regulation of bone homeostasis. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 181, Jan 14 2019.

CHEN, L.; ZHENG, H.; YU, X.; LIU, L. *et al.* Tumor-Secreted GRP78 Promotes the Establishment of a Pre-metastatic Niche in the Liver Microenvironment. **Front Immunol**, 11, p. 584458, 2020.

CHOI, Y. P.; LEE, J. H.; GAO, M. Q.; KIM, B. G. *et al.* Cancer-associated fibroblast promote transmigration through endothelial brain cells in three-dimensional in vitro models. **Int J Cancer**, 135, n. 9, p. 2024-2033, Nov 1 2014.

CONTRERAS-ZÁRATE, M. J.; DAY, N. L.; ORMOND, D. R.; BORGES, V. F. *et al.* Estradiol induces BDNF/TrkB signaling in triple-negative breast cancer to promote brain metastases. **Oncogene**, 38, n. 24, p. 4685-4699, Jun 2019.

COSTA, P. A. C.; SILVA, W. N.; PRAZERES, P.; PICOLI, C. C. *et al.* Chemogenetic modulation of sensory neurons reveals their regulating role in melanoma progression. **Acta Neuropathol Commun**, 9, n. 1, p. 183, Nov 16 2021.

DANAELI, G.; VANDER HOORN, S.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. *et al.* Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet**, 366, n. 9499, p. 1784-1793, Nov 19 2005.

DAWSON, C. A.; VISVADER, J. E. The Cellular Organization of the Mammary Gland: Insights From Microscopy. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 26, n. 1, p. 71-85, Mar 2021.

DE CASTRO JUNIOR, G.; PUGLISI, F.; DE AZAMBUJA, E.; EL SAGHIR, N. S. *et al.* Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the "do ut des" paradigm). **Crit Rev Oncol Hematol**, 59, n. 1, p. 40-50, Jul 2006.

DENNY-BROWN, D. Primary sensory neuropathy with muscular changes associated with carcinoma. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 11, n. 2, p. 73-87, May 1948.

DJOUHRI, L.; FANG, X.; OKUSE, K.; WOOD, J. N. *et al.* The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. **J Physiol**, 550, n. Pt 3, p. 739-752, Aug 1 2003.

DRELL, T. L. t.; JOSEPH, J.; LANG, K.; NIGGEMANN, B. *et al.* Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. **Breast Cancer Res Treat**, 80, n. 1, p. 63-70, Jul 2003.

EICHMANN, A.; LE NOBLE, F.; AUTIERO, M.; CARMELIET, P. Guidance of vascular and neural network formation. **Curr Opin Neurobiol**, 15, n. 1, p. 108-115, Feb 2005.

ENTSCHLADEN, F.; DRELL, T. L. t.; LANG, K.; JOSEPH, J. *et al.* Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. **Lancet Oncol**, 5, n. 4, p. 254-258, Apr 2004.

ENTSCHLADEN, F.; PALM, D.; LANG, K.; DRELL, T. L. *et al.* Neoneurogenesis: tumors may initiate their own innervation by the release of neurotrophic factors in analogy to lymphangiogenesis and neoangiogenesis. **Med Hypotheses**, 67, n. 1, p. 33-35, 2006.

ERICKSON, A.; DEITEREN, A.; HARRINGTON, A. M.; GARCIA-CARABALLO, S. *et al.* Voltage-gated sodium channels: (Na(V)) gating the field to determine their contribution to visceral nociception. **J Physiol**, 596, n. 5, p. 785-807, Mar 1 2018.

ERIN, N.; AKDAS BARKAN, G.; HARMS, J. F.; CLAWSON, G. A. Vagotomy enhances experimental metastases of 4THMpc breast cancer cells and alters substance P level. **Regul Pept**, 151, n. 1-3, p. 35-42, Nov 29 2008.

ERIN, N.; BOYER, P. J.; BONNEAU, R. H.; CLAWSON, G. A. *et al.* Capsaicin-mediated denervation of sensory neurons promotes mammary tumor metastasis to lung and heart. **Anticancer Res**, 24, n. 2b, p. 1003-1009, Mar-Apr 2004.

EWENS, A.; MIHICH, E.; EHRKE, M. J. J. A. r. Distant metastasis from subcutaneously grown E0771 medullary breast adenocarcinoma. 25, n. 6B, p. 3905-3915, 2005.

FELTS, P. A.; YOKOYAMA, S.; DIB-HAJJ, S.; BLACK, J. A. *et al.* Sodium channel alpha-subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1): different expression patterns in developing rat nervous system. **Brain Res Mol Brain Res**, 45, n. 1, p. 71-82, Apr 1997.

FENTEANY, G.; JANMEY, P. A.; STOSSEL, T. P. Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. **Curr Biol**, 10, n. 14, p. 831-838, Jul 13 2000.

FERREIRA, E. N.; BRIANESE, R. C.; DE ALMEIDA, R. V. B.; DRUMMOND, R. D. *et al.* Influence of BRCA1 Germline Mutations in the Somatic Mutational Burden of Triple-Negative Breast Cancer. **Transl Oncol**, 12, n. 11, p. 1453-1460, Nov 2019.

FOLGUEIRA, M. A.; MAISTRO, S.; KATAYAMA, M. L.; ROELA, R. A. *et al.* Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series. **Biosci Rep**, 33, n. 6, Dec 12 2013.

FOLKMAN, J.; WATSON, K.; INGBER, D.; HANAHAN, D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**, 339, n. 6219, p. 58-61, May 4 1989.

FOSTER, C. A.; MANDAK, B.; KROMER, E.; ROT, A. Calcitonin gene-related peptide is chemotactic for human T lymphocytes. **Ann N Y Acad Sci**, 657, p. 397-404, Jun 30 1992.

- FOURIE, C.; DAVIS, T.; KRIEL, J.; ENGELBRECHT, A. M. The paracrine effects of fibroblasts on Doxorubicin-treated breast cancer cells. **Exp Cell Res**, 381, n. 2, p. 280-287, Aug 15 2019.
- GAST, C. E.; SILK, A. D.; ZAROOUR, L.; RIEGLER, L. *et al.* Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival. **Sci Adv**, 4, n. 9, p. eaat7828, Sep 2018.
- GAUTRON, L.; SAKATA, I.; UDIT, S.; ZIGMAN, J. M. *et al.* Genetic tracing of Nav1.8-expressing vagal afferents in the mouse. **J Comp Neurol**, 519, n. 15, p. 3085-3101, Oct 15 2011.
- GOULD ROTHBERG, B. E.; BRACKEN, M. B. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, 100, n. 2, p. 139-148, Nov 2006.
- GRABOWSKI, P.; MAASER, K.; HANSKI, C.; STEIN, H. *et al.* Prognostic value of multimarker analysis in stage III colorectal cancer: one step forward towards an individualized therapy decision. 28, n. 8\_9, p. 399-403, 2005.
- GRABOWSKI, P.; SCHÖNFELDER, J.; AHNERT-HILGER, G.; FOSS, H.-D. *et al.* Expression of neuroendocrine markers: a signature of human undifferentiated carcinoma of the colon and rectum. 441, n. 3, p. 256-263, 2002.
- GRAY, M. J.; GONG, J.; HATCH, M. M.; NGUYEN, V. *et al.* Phosphatidylserine-targeting antibodies augment the anti-tumorigenic activity of anti-PD-1 therapy by enhancing immune activation and downregulating pro-oncogenic factors induced by T-cell checkpoint inhibition in murine triple-negative breast cancers. **Breast Cancer Res**, 18, n. 1, p. 50, May 11 2016.
- GU, J. W.; YOUNG, E.; BUSBY, B.; COVINGTON, J. *et al.* Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis, and growth of breast cancer in female mice. **Cancer Biol Ther**, 8, n. 6, p. 514-521, Mar 15 2009.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**, 12, n. 1, p. 31-46, Jan 2022.
- HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, 21, n. 3, p. 309-322, Mar 20 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.

HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J.; GNANT, M. *et al.* Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers**, 5, n. 1, p. 66, Sep 23 2019.

HERZIG, M.; SAVARESE, F.; NOVATCHKOVA, M.; SEMB, H. *et al.* Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of beta-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling. **Oncogene**, 26, n. 16, p. 2290-2298, Apr 5 2007.

HIRAGA, T.; NINOMIYA, T. Establishment and characterization of a C57BL/6 mouse model of bone metastasis of breast cancer. **J Bone Miner Metab**, 37, n. 2, p. 235-242, Mar 2019.

HIRATSUKA, S.; NAKAMURA, K.; IWAI, S.; MURAKAMI, M. *et al.* MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. **Cancer Cell**, 2, n. 4, p. 289-300, Oct 2002.

HOMBURGER, F. Studies on Hypoproteinemia: III. Lymphoid Hyperplasia and Redistribution of Nitrogen Caused in Mice by Transplanted Tumors (Sarcoma 180 and Breast Adenocarcinoma EO 771). **Science**, 107, n. 2790, p. 648-649, Jun 18 1948.

HONVO-HOUÉTO, E.; TRUCHET, S. Indirect Immunofluorescence on Frozen Sections of Mouse Mammary Gland. **J Vis Exp**, n. 106, Dec 1 2015.

HOOVER, R. G.; GULLICKSON, G.; KORNBLUTH, J. Natural killer lytic-associated molecule plays a role in controlling tumor dissemination and metastasis. **Front Immunol**, 3, p. 393, 2012.

HOSONAGA, M.; SAYA, H.; ARIMA, Y. Molecular and cellular mechanisms underlying brain metastasis of breast cancer. **Cancer Metastasis Rev**, 39, n. 3, p. 711-720, Sep 2020.

HU, B.; LV, X.; CHEN, H.; XUE, P. *et al.* Sensory nerves regulate mesenchymal stromal cell lineage commitment by tuning sympathetic tones. **J Clin Invest**, 130, n. 7, p. 3483-3498, Jul 1 2020.

HUANG, D.; SU, S.; CUI, X.; SHEN, X. *et al.* Nerve fibers in breast cancer tissues indicate aggressive tumor progression. **Medicine (Baltimore)**, 93, n. 27, p. e172, Dec 2014.

HUANG, Y.; MA, C.; ZHANG, Q.; YE, J. *et al.* CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. **Oncotarget**, 6, n. 19, p. 17462-17478, Jul 10 2015.

HUNTER, K. W.; CRAWFORD, N. P. S.; ALSARRAJ, J. Mechanisms of metastasis. **Breast cancer research : BCR**, 10 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S2-S2, 2008.

Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de mama**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>.

International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>

ISOM, L. L. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. **Neuroscientist**, 7, n. 1, p. 42-54, Feb 2001.

IWATSUKI, M.; MIMORI, K.; YOKOBORI, T.; ISHI, H. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. **Cancer Sci**, 101, n. 2, p. 293-299, Feb 2010.

JIANG, X.; SHAPIRO, D. J. The immune system and inflammation in breast cancer. **Mol Cell Endocrinol**, 382, n. 1, p. 673-682, Jan 25 2014.

JOHNSTONE, C. N.; SMITH, Y. E.; CAO, Y.; BURROWS, A. D. *et al.* Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. **Dis Model Mech**, 8, n. 3, p. 237-251, Mar 2015.

KAMIYA, A.; HAYAMA, Y.; KATO, S.; SHIMOMURA, A. *et al.* Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression. **Nature Neuroscience**, 22, n. 8, p. 1289-1305, 2019/08/01 2019.

KAPPOS, E. A.; ENGELS, P. E.; TREMP, M.; SIEBER, P. K. *et al.* Denervation leads to volume regression in breast cancer. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, 71, n. 6, p. 833-839, Jun 2018.

KARKENI, E.; MORIN, S. O.; BOU TAYEH, B.; GOUBARD, A. *et al.* Vitamin D Controls Tumor Growth and CD8<sup>+</sup> T Cell Infiltration in Breast Cancer. **Front Immunol**, 10, p. 1307, 2019.

KASIKARA, C.; DAVRA, V.; CALIANESE, D.; GENG, K. *et al.* Pan-TAM Tyrosine Kinase Inhibitor BMS-777607 Enhances Anti-PD-1 mAb Efficacy in a Murine Model of Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Res**, 79, n. 10, p. 2669-2683, May 15 2019.

LAWSON, D. A.; KESSENBROCK, K.; DAVIS, R. T.; PERVOLARAKIS, N. *et al.* Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. **Nature Cell Biology**, 20, n. 12, p. 1349-1360, 2018/12/01 2018.

LE NAOUR, A.; ROSSARY, A.; VASSON, M. P. EO771, is it a well-characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty. **Cancer Med**, 9, n. 21, p. 8074-8085, Nov 2020.

LEE, Y. T. Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. **J Surg Oncol**, 23, n. 3, p. 175-180, Jul 1983.

LI, D.-M.; FENG, Y.-M. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. **Breast Cancer Research and Treatment**, 128, n. 1, p. 7, 2011/04/16 2011.

LIOTTA, L. A. An attractive force in metastasis. **Nature**, 410, n. 6824, p. 24-25, 2001/03/01 2001.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **J Cell Biol**, 196, n. 4, p. 395-406, Feb 20 2012.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 1, n. 4, p. 533-557, Jul-Aug 2012.

MAGNON, C. Role of the autonomic nervous system in tumorigenesis and metastasis. **Mol Cell Oncol**, 2, n. 2, p. e975643, Apr-Jun 2015.

MAGNON, C.; HALL, S. J.; LIN, J.; XUE, X. *et al.* Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. **Science**, 341, n. 6142, p. 1236361, Jul 12 2013.

MARCHESI, F.; PIEMONTI, L.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. **Cytokine Growth Factor Rev**, 21, n. 1, p. 77-82, Feb 2010.

MAURER-SCHULTZE, B.; BASSUKAS, I. D.; LOER, E. Growth and proliferation of a transplantable mouse tumor and of human tumors growing in nude mice. **Acta Histochem Suppl**, 39, p. 81-91, 1990.

MCSHERRY, E. A.; DONATELLO, S.; HOPKINS, A. M.; MCDONNELL, S. Molecular basis of invasion in breast cancer. **Cell Mol Life Sci**, 64, n. 24, p. 3201-3218, Dec 2007.

MEGO, M.; MANI, S. A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. **Nat Rev Clin Oncol**, 7, n. 12, p. 693-701, Dec 2010.

MIAO, X.-R.; GAO, X.-F.; WU, J.-X.; LU, Z.-J. *et al.* Bilateral downregulation of Nav1.8 in dorsal root ganglia of rats with bone cancer pain induced by inoculation with Walker 256 breast tumor cells. **BMC Cancer**, 10, n. 1, p. 216, 2010/05/20 2010.

MINETT, M. S.; EIJKELKAMP, N.; WOOD, J. N. Significant determinants of mouse pain behaviour. **PLoS One**, 9, n. 8, p. e104458, 2014.

MINN, A. J.; GUPTA, G. P.; SIEGEL, P. M.; BOS, P. D. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. **Nature**, 436, n. 7050, p. 518-524, Jul 28 2005.

MUKOUYAMA, Y. S.; SHIN, D.; BRITSCH, S.; TANIGUCHI, M. *et al.* Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. **Cell**, 109, n. 6, p. 693-705, Jun 14 2002.

MÜLLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, 410, n. 6824, p. 50-56, 2001/03/01 2001.

NACHAT-KAPPES, R.; PINEL, A.; COMBE, K.; LAMAS, B. *et al.* Effects of enriched environment on COX-2, leptin and eicosanoids in a mouse model of breast cancer. **PLoS One**, 7, n. 12, p. e51525, 2012.

NAGAKAWA, O.; OGASAWARA, M.; MURATA, J.; FUSE, H. *et al.* Effect of prostatic neuropeptides on migration of prostate cancer cell lines. **Int J Urol**, 8, n. 2, p. 65-70, Feb 2001.

NASCIMENTO, A. I.; MAR, F. M.; SOUSA, M. M. The intriguing nature of dorsal root ganglion neurons: Linking structure with polarity and function. **Prog Neurobiol**, 168, p. 86-103, Sep 2018.

NOBES, C. D.; HALL, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. **Cell**, 81, n. 1, p. 53-62, Apr 7 1995.

ONDICOVA, K.; MRAVEC, B. Role of nervous system in cancer aetiopathogenesis. **Lancet Oncol**, 11, n. 6, p. 596-601, Jun 2010.

OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. **Breast**, 22 Suppl 2, p. S66-72, Aug 2013.

PACHECO, D. D. F.; ROMERO, T. R. L.; DUARTE, I. D. G. Ketamine induces central antinociception mediated by endogenous cannabinoids and activation of CB(1) receptors. **Neurosci Lett**, 699, p. 140-144, Apr 23 2019.

PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. **Cancer Metastasis Rev**, 8, n. 2, p. 98-101, Aug 1989.

PARADA, C. A.; VIVANCOS, G. G.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q. *et al.* Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 5, p. 2923-2928, Mar 4 2003.

PAREDES, J.; CORREIA, A. L.; RIBEIRO, A. S.; ALBERGARIA, A. *et al.* P-cadherin expression in breast cancer: a review. **Breast Cancer Res**, 9, n. 5, p. 214, 2007.

PLANTE, I.; STEWART, M. K.; LAIRD, D. W. Evaluation of mammary gland development and function in mouse models. **J Vis Exp**, n. 53, Jul 21 2011.

PRAZERES, P.; LEONEL, C.; SILVA, W. N.; ROCHA, B. G. S. *et al.* Ablation of sensory nerves favours melanoma progression. **J Cell Mol Med**, 24, n. 17, p. 9574-9589, Sep 2020.

PUNDAVELA, J.; ROSELLI, S.; FAULKNER, S.; ATTIA, J. *et al.* Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer. **Mol Oncol**, 9, n. 8, p. 1626-1635, Oct 2015.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, 19, n. 11, p. 1423-1437, Nov 2013.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, 111, n. 4, p. 409-419, Sep 1 1957.

RIBEIRO, A. S.; PAREDES, J. P-Cadherin Linking Breast Cancer Stem Cells and Invasion: A Promising Marker to Identify an "Intermediate/Metastable" EMT State. **Front Oncol**, 4, p. 371, 2014.

RICHERT, M. M.; SCHWERTFEGER, K. L.; RYDER, J. W.; ANDERSON, S. M. An atlas of mouse mammary gland development. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 5, n. 2, p. 227-241, Apr 2000.

RIGHI, M.; LOCATELLI, S. L.; CARLO-STELLA, C.; PRESTA, M. *et al.* Vascular amounts and dispersion of caliber-classified vessels as key parameters to quantitate 3D micro-angioarchitectures in multiple myeloma experimental tumors. **Scientific Reports**, 8, n. 1, p. 17520, 2018/11/30 2018.

RILLEMA, J. A. Development of the mammary gland and lactation. **Trends Endocrinol Metab**, 5, n. 4, p. 149-154, May-Jun 1994.

RUFF, M.; SCHIFFMANN, E.; TERRANOVA, V.; PERT, C. B. Neuropeptides are chemoattractants for human tumor cells and monocytes: a possible mechanism for metastasis. **Clin Immunol Immunopathol**, 37, n. 3, p. 387-396, Dec 1985.

RUSSO, I. H.; RUSSO, J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. **Environ Health Perspect**, 104, n. 9, p. 938-967, Sep 1996.

SALOMAN, J. L.; ALBERS, K. M.; LI, D.; HARTMAN, D. J. *et al.* Ablation of sensory neurons in a genetic model of pancreatic ductal adenocarcinoma slows initiation and progression of cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 113, n. 11, p. 3078-3083, Mar 15 2016.

SANCHO-GARNIER, H.; COLONNA, M. J. L. P. M. Épidémiologie des cancers du sein. 48, n. 10, p. 1076-1084, 2019.

SARHADI, N. S.; SHAW DUNN, J.; LEE, F. D.; SOUTAR, D. S. An anatomical study of the nerve supply of the breast, including the nipple and areola. **Br J Plast Surg**, 49, n. 3, p. 156-164, Apr 1996.

SCHAIBLE, H.-G. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, 16, n. 5, p. 470, 2014/10/30 2014.

SCULLY, O. J.; BAY, B. H.; YIP, G.; YU, Y. Breast cancer metastasis. **Cancer Genomics Proteomics**, 9, n. 5, p. 311-320, Sep-Oct 2012.

SEIFERT, P.; BENEDIC, M.; EFFERT, P. Nerve fibers in tumors of the human urinary bladder. **Virchows Arch**, 440, n. 3, p. 291-297, Mar 2002.

SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Ann Oncol**, 26, n. 7, p. 1291-1299, Jul 2015.

SIMS, A. H.; HOWELL, A.; HOWELL, S. J.; CLARKE, R. B. Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. **Nat Clin Pract Oncol**, 4, n. 9, p. 516-525, Sep 2007.

SOLINAS, G.; GERMANO, G.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **J Leukoc Biol**, 86, n. 5, p. 1065-1073, Nov 2009.

SOUSA, B.; PEREIRA, J.; PAREDES, J. The Crosstalk Between Cell Adhesion and Cancer Metabolism. **Int J Mol Sci**, 20, n. 8, Apr 19 2019.

SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S. E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. **Pathobiology**, 82, n. 3-4, p. 142-152, Sep 2015.

SPINA, E.; COWIN, P. Embryonic mammary gland development. **Semin Cell Dev Biol**, 114, p. 83-92, Jun 2021.

STIRLING, L. C.; FORLANI, G.; BAKER, M. D.; WOOD, J. N. *et al.* Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1.8-Cre recombinase mice. **Pain**, 113, n. 1-2, p. 27-36, Jan 2005.

STÖTH, M.; FREIRE VALLS, A.; CHEN, M.; HIDDING, S. *et al.* Splenectomy reduces lung metastases and tumoral and metastatic niche inflammation. **Int J Cancer**, 145, n. 9, p. 2509-2520, Nov 1 2019.

SUGIURA, K.; STOCK, C. C. Studies in a tumor spectrum. I. Comparison of the action of methylbis (2-chloroethyl)amine and 3-bis(2-chloroethyl)aminomethyl-4-methoxymethyl -5-

hydroxy-6-methylpyridine on the growth of a variety of mouse and rat tumors. **Cancer**, 5, n. 2, p. 382-402, Mar 1952.

TAN, W.; ZHANG, W.; STRASNER, A.; GRIVENNIKOV, S. *et al.* Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. **Nature**, 470, n. 7335, p. 548-553, Feb 24 2011.

TANJORE, H.; KALLURI, R. The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. **Am J Pathol**, 168, n. 3, p. 715-717, Mar 2006.

THIKE, A. A.; CHEOK, P. Y.; JARA-LAZARO, A. R.; TAN, B. *et al.* Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. **Mod Pathol**, 23, n. 1, p. 123-133, Jan 2010.

TODA, M.; SUZUKI, T.; HOSONO, K.; HAYASHI, I. *et al.* Neuronal system-dependent facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 36, p. 13550-13555, Sep 9 2008.

TRYNDYAK, V. P.; BELAND, F. A.; POGRIBNY, I. P. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. **Int J Cancer**, 126, n. 11, p. 2575-2583, Jun 1 2010.

TU, M. M.; RAHIM, M. M. A.; SAYED, C.; MAHMOUD, A. B. *et al.* Immunosurveillance and Immunoediting of Breast Cancer via Class I MHC Receptors. **Cancer Immunol Res**, 5, n. 11, p. 1016-1028, Nov 2017.

TURASHVILI, G.; MCKINNEY, S. E.; GOKTEPE, O.; LEUNG, S. C. *et al.* P-cadherin expression as a prognostic biomarker in a 3992 case tissue microarray series of breast cancer. **Mod Pathol**, 24, n. 1, p. 64-81, Jan 2011.

VANHECKE, E.; ADRIAENSSENS, E.; VERBEKE, S.; MEIGNAN, S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. 17, n. 7, p. 1741-1752, 2011.

WANG, M.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; WEI, F. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **J Cancer**, 8, n. 5, p. 761-773, 2017.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN 'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nat Rev Cancer**, 5, n. 8, p. 591-602, Aug 2005.

WINTERS, S.; MARTIN, C.; MURPHY, D.; SHOKAR, N. K. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. **Prog Mol Biol Transl Sci**, 151, p. 1-32, 2017.

XIONG, Y.; RUSSELL, D. L.; MCDONALD, L. T.; COWART, L. A. *et al.* Hematopoietic Stem Cell-derived Adipocytes Promote Tumor Growth and Cancer Cell Migration. **Int J Cancer Res Mol Mech**, 3, n. 1, 2017.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. **Mol Cancer Res**, 8, n. 5, p. 629-642, May 2010.

ZAHALKA, A. H.; FRENETTE, P. S. Nerves in cancer. **Nature Reviews Cancer**, 20, n. 3, p. 143-157, 2020/03/01 2020.

ZHAO, C. M.; HAYAKAWA, Y.; KODAMA, Y.; MUTHUPALANI, S. *et al.* Denervation suppresses gastric tumorigenesis. **Sci Transl Med**, 6, n. 250, p. 250ra115, Aug 20 2014.

ZHAO, Q.; YANG, Y.; LIANG, X.; DU, G. *et al.* The clinicopathological significance of neurogenesis in breast cancer. **BMC Cancer**, 14, n. 1, p. 484, 2014/07/04 2014.

ZHU, S.; ZIDAN, A.; PANG, K.; MUSAYEVA, A. *et al.* Promotion of corneal angiogenesis by sensory neuron-derived calcitonin gene-related peptide. **Exp Eye Res**, 220, p. 109125, May 23 2022.

## 10. APÊNDICE

- Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG***



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Papel dos nervos sensoriais na progressão do tumor de mama", protocolo do CEUA: 44/2021 sob a responsabilidade de Alexander Birbrair que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 24/05/2021.

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Vigência da Autorização  | 24/05/2021 a 23/05/2026                                    |
| Finalidade               | Pesquisa   |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo transgênico / C57BL/6 - Nav1.8-Cre/TdTomato     |
| Nº de animais            | 4  |
| Peso/Idade               | 20g / 8(semanas)   |
| Sexo                     | feminino   |
| Origem                   | Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313 |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo transgênico / C57BL/6 - Nav1.8-Cre/TdTomato     |
| Nº de animais            | 4  |
| Peso/Idade               | 20g / 8(semanas)   |
| Sexo                     | feminino   |
| Origem                   | Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313 |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo isogênico / C57BL/6 - WT                        |
| Nº de animais            | 4  |
| Peso/Idade               | 20g / 8(semanas)   |
| Sexo                     | feminino   |
| Origem                   | Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313 |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo isogênico / C57BL/6 - WT                        |
| Nº de animais            | 4  |
| Peso/Idade               | 20g / 8(semanas)   |
| Sexo                     | feminino   |
| Origem                   | Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313 |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo transgênico / C57BL/6 - Nav1.8-Cre/TdTomato     |
| Nº de animais            | 4  |
| Peso/Idade               | 20g / 8(semanas)   |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Sexo                     | feminino   |
| Origem                   | Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313 |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo transgênico / C57BL/6 - Nav1.8-Cre/TdTomato     |
| Nº de animais            | 4  |
| Peso/idade               | 20g / 8(semanas)   |
| Sexo                     | feminino   |
| Origem                   | Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313 |

Considerações posteriores:

|            |  |
|------------|--|
| 24/05/2021 | Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 24/05/2021. Validade: 24/05/2021 à 23/05/2026 |
|------------|--|

Belo Horizonte, 24/04/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

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