

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

Paulo Roberto Moreira Lauer

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO QUIMIOGENÉTICA DE NEURÔNIOS
SENSORIAIS NOCICEPTIVOS Nav1.8 NA DISSEMINAÇÃO METASTÁTICA
ESPONTÂNEA DO CARCINOMA MAMÁRIO E0771 PARA O PULMÃO**

Belo Horizonte – MG

2024

Paulo Roberto Moreira Lauar

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO QUIMIOGENÉTICA DE NEURÔNIOS
SENSORIAIS NOCICEPTIVOS Nav1.8 NA DISSEMINAÇÃO METASTÁTICA
ESPONTÂNEA DO CARCINOMA MAMÁRIO E0771 PARA O PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Dr. Alexander Birbrair

Coorientadores: Dr. Remo Castro Russo

Dra. Patrícia Rocha Martins

Belo Horizonte – MG

2024

043

Lauar, Paulo Roberto Moreira.

Avaliação da modulação quimiogênica de neurônios sensoriais nociceptivos nav1.8 na disseminação metastática espontânea do carcinoma mamário e0771 para o pulmão [manuscrito] / Paulo Roberto Moreira Lauar. – 2024.

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

Orientador: Dr. Alexander Birbrair. Coorientadores: Dr. Remo Castro Russo; Dra. Patrícia Rocha Martins.

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

1. Patologia. 2. Neoplasias da Mama. 3. Células Receptoras Sensoriais. 4. Metástase Neoplásica. 5. Pulmão. I. Birbrair, Alexander. II. Russo, Remo Castro. III. Martins, Patrícia Rocha. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Avaliação da Modulação Quimiogenética de Neurônios Sensoriais Nociceptivos nav 1.8 na Disseminação Metastática Espontânea do Carcinoma Mamário E0771 para o Pulmão”

PAULO ROBERTO MOREIRA LAUAR

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

Aprovada em 21 de março, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Dr. Helton Da Costa Santiago, ICB/UFMG

Prof. Dr. Bryan Ôrtero Perez Gonçalves, Instituto Mário Penna - IEPI/BH

Residente Pós-Doc Dra. Patrícia Rocha Martins, ICB/UFMG - COORIENTADORA

Dr. Remo Castro Russo, ICB, UFMG - COORIENTADOR

Belo Horizonte, 21 de março de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo, Professor do Magistério Superior**, em 22/04/2024, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Rocha Martins, Usuário Externo**, em 23/04/2024, às 09:31, 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 **Helton da Costa Santiago, Professor do Magistério Superior**, em 24/04/2024, às 09:10, 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 **Bryan Ortero Perez Goncalves, Usuário Externo**, em 24/04/2024, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3176401** e o código CRC **0BD5BC52**.

COLABORAÇÕES

Esse trabalho foi desenvolvido no BirbrairLab em parceria com o Laboratório de Microambiente Tecidual e o Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, situados no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pertencentes ao Departamento de Patologia Geral e ao Departamento de Fisiologia e Biofísica. Contando com a colaboração dos seguintes pesquisadores:

- **Dr. Alexander Birbrair – University of Wisconsin-Madison (EUA)**
- **Dr. Remo Castro Russo – UFMG**
- **Dra. Patrícia Rocha Martins – UFMG**
- **Dr. Geovanni Dantas Cassali – UFMG**
- **Dra. Sara Bernardes – UFMG**
- **Dr. Leonardo Gomes Vaz – UFMG**
- **Dr. Helton da Costa Santiago – UFMG**
- **Dr. Daniel Portela Dias Machado – UFMG**
- **Dr. Bryan Ôrtero Perez Gonçalves – Núcleo de pesquisa Mário Penna**
- **Dr. Ricardo Gonçalves – UFMG**
- **Dra. Paula Peixoto – UFMG**
- **Msc. Marisa Salvi – UFMG**
- **Msc. Sheu Oluwadare Sulaiman – UFMG**
- **Msc. Abdulhakeem Biola Ajibike – USP**
- **Msc. Leonardo de Paula Pereira – IRR/Fiocruz Minas**
- **Msc. Bruna Nathália Santos**
- **Msc. Pierre Henrique de Menezes Paixão**
- **Msc. Igor de Campos Fontes**
- **Milla Reis Almeida**
- **Amanda Miguel Sousa**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado a oportunidade de viver e por ter me sustentado desde o meu nascimento até os dias atuais. Sem a presença do Senhor Deus em minha vida e sem a Sua voz me concedendo sabedoria e proteção, certamente não estaria vivo e sequer realizaria este sonho.

Aos meus pais, Iraide Moreira e Cassio Murilo, que sempre me estimularam e apoiaram desde a infância a estudar, bem como a ser um homem de caráter e valores. Além de terem me proporcionado uma vida confortável com muito suor e abnegação, abrindo mão de muitos sonhos pessoais em prol da minha formação como ser humano e profissional. Estendo este agradecimento aos demais familiares.

À minha namorada Brennda Fernanda, que conheci durante a graduação e que se tornou não apenas uma colega profissional, mas minha parceira de vida. Sou muito grato por todo o companheirismo, paciência e amor que ela tem me proporcionado a quase 5 anos.

A todos os professores que passaram pela minha vida e me influenciaram no campo dos estudos, agradeço a todas as instituições de ensino que me acolheram até o presente momento: Instituto Educacional Amar, Escola Municipal Machado de Assis, Escola Estadual Ruy Pimenta, Escola Estadual do Bairro São Caetano, Universidade UNA (Contagem) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Um agradecimento especial aos meus coorientadores do mestrado, Patrícia Martins e Remo Castro, que me acolheram tão bem, oferecendo todo o suporte necessário para dar continuidade ao meu mestrado e proporcionando-me valiosos ensinamentos de vida. Agradeço também ao meu orientador, Alexander Birbrair, por ter aberto as portas do laboratório para mim, assim como às professoras Sara Bernardes e Amanda Sena, que mantiveram essas portas abertas após o encerramento do ciclo do Alexander como professor da UFMG.

Agradeço a todas as equipes com as quais tive o prazer de conviver e trabalhar no Birbrair Lab (UFMG), no Laboratório de Microambiente Tecidual (UFMG) e no Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar (UFMG). Expresso minha gratidão aos grandes amigos que fiz durante esse período, em especial a amizade de Bryan Perez, Alinne Costa, Patrícia Martins, Milla Reis, Remo Castro, Sheu Oluwadare, Abdulhakeem Biola, Pedro Dias Prazeres, Pedro Augusto Carvalho Costa e Walison Nunes. Todos vocês foram fonte de inspiração e me ensinaram muito em diversas etapas, desde minha iniciação científica até o momento presente.

Agradeço também aos demais amigos que passaram e permaneceram em minha vida, destacando-se Yuri Cedro, Leonardo Carvalho, Gabriel Jacquess, Victor Martins, Kelvin Fagundes, Douglas Macedo, Vitória Ellen, Michelle Ferreira, Isabella de Oliveira e Flavio Junio.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da UFMG, assim como a todos os professores vinculados. Estendo meus agradecimentos a todos os funcionários do ICB/UFMG, ao centro de aquisições e processamento de imagens (CAPI) e aos órgãos financiadores responsáveis por manter a ciência brasileira: CAPES, FAPEMIG e CNPq.

*“E essa aqui eu vou cantar para aquela professora que sempre me tirava de burro, para os que não foram com a minha cara, e para aquelas pessoas que eu gritei ajuda e se fizeram de surdo, para uns vizinhos lá do bairro, umas amigas da minha mãe **“o seu filho é marginal e não vai ter futuro”**, mas estou aqui pra te mostrar que favelado também pode, olha nós destravando no mundo. E aonde nós chegou.....”* (Mc Lipi – Só Gratidão)

Resumo

O câncer de mama é o mais comum e o mais letal dentre as neoplasias que acomete as mulheres mundialmente. A maior porcentagem dos óbitos por câncer está relacionada a invasão metastática, tornando a metástase um dos principais focos de estudo nas últimas décadas. Um dos nichos metastáticos do câncer de mama mais frequentes é o pulmão. Embora o microambiente pulmonar tenha sido amplamente estudado quanto a sua estrutura circulatória constitutiva, possivelmente mais favorável a adesão de células neoplásicas que se desprendem da massa tumoral primária e atingem a circulação, células imunológicas residentes e outras estruturas que compõe o microambiente pulmonar, tem sido caracterizadas como possíveis alvos de comunicação entre os tumor primário e o pulmão, antes mesmo das células neoplásicas se instalarem nesse tecido, promovendo o chamado nicho pré-metastático. Estudos tem caracterizado a presença de ramificações neuronais, invadindo os tumores de mama, no entanto, ainda falta compreender qual a influência dos neurônios sensoriais no câncer de mama, e seu papel na disseminação metastática. Nesse trabalho, foi utilizado animais transgênicos com fluorescência endógena vermelha (*TdTomato*) e uma tecnologia DREADD (*Designer Receptors Exclusively Activated by a Designer Drug*), para realizar a quimiomodulação de neurônios sensoriais Nav 1.8 utilizando-se a droga N-óxido de clozapina (CNO). Foi realizado o cruzamento de animais Nav 1.8 com animais DREADDs que possuem a enzima cre recobinase ligada a proteína G Hm3Dq, originando filhotes Nav 1.8 Cre⁺ / Hm3Dq⁺ (grupo neuromodulado, n=7) e Nav 1.8 Cre⁻ / Hm3Dq⁺ (grupo controle, n=7). Assim, a estimulação dos neurônios sensoriais pode ser induzida quimicamente pela administração de CNO. Assim, caracterizamos a presença de terminações nociceptivas Nav1.8 no tecido pulmonar, através de microscopia de fluorescência. Além disso observamos que a modulação quimiogenética desses neurônios Nav1.8 desempenha um papel crucial na preservação da função pulmonar ventilatória, comprovada pela técnica de espirometria. Observamos também que em animais que tiveram a inervação sensorial superestimulada (Nav 1.8 Cre⁺ / Hm3Dq⁺), apresentaram significativa redução dos focos de infiltrado inflamatório associado a metástase espontânea no pulmão, e uma redução na população de macrófagos no microambiente pulmonar, o que é frequentemente associada a um pior prognóstico metastático no câncer de mama. Além disso, foi caracterizado que a modulação dos neurônios sensoriais Nav1.8 promove uma redução na população de células de perfil imunoregulador como ILC3 Reg, células Treg⁺CD4⁺ e células Tc2⁺CD8⁺ no microambiente tumoral. Além de aumentar a população de células efetoras de perfil citotóxico Tc1⁺CD8⁺ no microambiente tumoral. Portanto, nossos achados indicam um efeito imunoprotetor da inervação sensorial, desenvolvido pela modulação dos neurônios sensoriais Nav1.8, desfavorecendo a progressão tumoral e a metastatização pulmonar.

Palavras-chave: Modulação quimiogenética, Câncer de mama, Neurônios sensoriais, Microambiente pulmonar, Metástase.

Abstract

Breast cancer is the most common and deadliest neoplasm affecting women worldwide. The majority of cancer-related deaths are attributed to metastatic invasion, making metastasis a key focus of study in recent decades. One of the most frequent metastatic niches for breast cancer is the lung. Although the pulmonary microenvironment has been extensively studied regarding its constitutive circulatory structure, which may be more favorable for the adhesion of neoplastic cells detaching from the primary tumor mass and reaching circulation, resident immunologic cells and other structures within the pulmonary microenvironment have been characterized as potential communication targets between the primary tumor and the lung, even before neoplastic cells settle in this tissue, promoting the so-called pre-metastatic niche. Studies have characterized the presence of neuronal ramifications invading breast tumors; however, understanding the influence of sensory neurons in breast cancer and their role in metastatic dissemination remains incomplete. In this study, transgenic animals with red endogenous fluorescence (*TdTomato*) and a Designer Receptors Exclusively Activated by a Designer Drug (DREADD) technology were used to perform chemomodulation of Nav 1.8 sensory neurons using N-oxide clozapine (CNO). Animals carrying Nav 1.8 were crossed with DREADD animals harboring the cre recombinase enzyme linked to the G protein Hm3Dq, resulting in Nav 1.8 Cre⁺/Hm3Dq⁺ (neuromodulated group, n=7) and Nav 1.8 Cre⁻/Hm3Dq⁺ (control group, n=7) offspring. Thus, sensory neuron stimulation could be chemically induced by CNO administration. We characterized the presence of nociceptive terminations Nav1.8 in lung tissue through fluorescence microscopy. Additionally, we observed that chemogenetic modulation of these Nav1.8 neurons plays a crucial role in preserving ventilatory lung function, as evidenced by spirometry. Furthermore, animals with overstimulated sensory innervation (Nav 1.8 Cre⁺/Hm3Dq⁺) showed a significant reduction in inflammatory infiltrate foci associated with spontaneous lung metastasis and a decrease in the macrophage population in the pulmonary microenvironment, which is often associated with a worse metastatic prognosis in breast cancer. Moreover, it was characterized that modulation of sensory neurons Nav1.8 promotes a reduction in the population of immunoregulatory profile cells such as ILC3 Reg, Treg⁺CD4⁺ cells, and Tc2⁺CD8⁺ cells in the tumor microenvironment, while increasing the population of cytotoxic effector cells with Tc1⁺CD8⁺ profile. Therefore, our findings indicate an immunoprotective effect of sensory innervation, developed by modulation of sensory neurons Nav1.8, hindering tumor progression and pulmonary metastasis.

Keywords: Chemogenetic modulation, Breast cancer, Sensory neurons, Pulmonary microenvironment, Metastasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cruzamento e plano experimental	25
Figura 2: Estratégia de gate aplicada	31
Figura 3: Caracterização de neurônios sensoriais Nav1.8 no pulmão	34
Figura 4: Testes nociceptivos e avaliação do tumor	36
Figura 5: Função pulmonar	38
Figura 6: Infiltrado inflamatório associado a metástase e macrófagos	40
Figura 7: Citometria de ILCs intratumoral	42
Figura 8: Citometria de células de perfil linfóide adaptativo no microambiente tumoral	43
Figura 9: Citometria de células mieloides intratumoral	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- Calb1 – Calbindina-1
- Cchord – Complacência Estática
- CDIS – Carcinoma Ductal in situ
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- Cdyn – Complacência Dinâmica
- CLI – Carcinoma Lobular in situ
- CLIS – Carcinoma Lobular in situ
- CCR2 - Receptor da quimiocina ligante 2
- CCL2 - Quimiocina Ligante 2
- DRG – Gânglio da Raiz Dorsal
- DREADD - Designer Receptors Exclusively Activated by a Designer Drug
- FEV20ms – Volume Expiratório Forçado em 20 milissegundos
- FEV50ms – Volume Expiratório Forçado em 50 milissegundos
- FVC – Capacidade Vital Forçada
- HER2 – Receptor do Fator de Crescimento Epidermico Humano 2
- hM3Dq – Receptor Muscarínico Humano acoplado a proteína Gq
- IC – Capacidade Inspiratória
- IL – Interleucina
- ILC1 – Célula Linfóide Inata do tipo I
- ILC2 – Célula Linfóide Inata do tipo II
- ILC3 – Célula Linfóide Inata do tipo III
- LSL – LoxP, Stop códon, LoxP
- M1 - Macrófago Ativado (Macrófago do tipo 1)
- M2 - Macrófago Alternativamente Ativado (Macrófago do tipo 2)
- MHC II - Complexo principal de Histocompatibilidade classe II
- MEC - Matriz Extracelular
- Nav1.8 – Sódio Voltagem 1.8
- NGF - Fator de Crescimento Neural
- NO - Óxido Nítrico
- NST – Carcinoma Ductal Sem Tipo Especial
- PNI - Invasão Peri-Neural

R26 – Rosa 26

RE – Receptor de Estrogênio

RL – Resistência Pulmonar

RP – Receptor de Progesterona

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

T.A - Temperatura Ambiente

Tac1 – Taquiquina-1

TAMs - Macrófagos Associados ao Tumor

Th1 - Células T auxiliares do tipo I

Th2 - Células T auxiliares do tipo II

TNF α - Fator de Necrose Tumoral α

TRPV1 – Receptor de Potencial Transitório Vaniloide tipo 1

TLRs - Receptores Toll-Like

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Câncer de mama e metástase	13
2.2. Microambiente Tumoral.....	15
2.3. Microambiente metastático pulmonar	16
2.4. Relações neuroimune no câncer e no pulmão.....	19
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo geral	21
4.2. Objetivos específicos	22
6. RESULTADOS.....	32
6.1. Caracterização da inervação sensorial pulmonar	32
6.2. Modulação quimiogenética de neurônios sensoriais Nav1.8	33
6.3. Avaliação da função pulmonar dos animais modulados quimiogeneticamente	36
6.4. Avaliação do infiltrado inflamatório associado a metástase e quantificação de macrófagos no microambiente pulmonar	37
6.5. Avaliação do perfil linfóide inato (ILC) intratumoral	40
6.6. Avaliação do perfil linfóide adaptativo no microambiente tumoral	41
6.7. Avaliação do perfil de células mieloides intratumoral.....	42
7. DISCUSSÃO	43
8. CONCLUSÃO	46
9. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma das doenças mais prevalentes e letais entre as mulheres em todo o mundo. Com números alarmantes de diagnósticos e óbitos associados a essa enfermidade, a pesquisa científica tem buscado compreender melhor suas causas e mecanismos de disseminação. Um dos componentes do microambiente tumoral que tem ganhado destaque em anos recentes é a presença de nervos dentro da massa tumoral. Estudos têm revelado a importância do sistema nervoso no contexto do microambiente tumoral, destacando o papel dos neurônios sensoriais em interações complexas como caracterizadas no melanoma (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021), bem como o papel de neurônios simpáticos e parassimpáticos que foram explorados no câncer de mama (AUSTIN; ELLIOTT; NICOLAOU; GRABOWSKA *et al.*, 2017; KAMIYA; HAYAMA; KATO; SHIMOMURA *et al.*, 2019).

Os avanços tecnológicos têm permitido a identificação de ramificações neuronais em diversos tipos de tumores, incluindo o câncer de mama (REAVIS; CHEN; DRAPKIN, 2020; RESTAINO; VERMEER, 2022). No entanto, o entendimento preciso do impacto dos neurônios sensoriais na formação de metástases ainda é limitado. É crucial investigar como esses neurônios interagem com o microambiente tumoral mamário e pulmonar, especialmente considerando a rica presença de macrófagos nesses tecidos.

Estudos anteriores demonstraram que a atuação dos neurônios sensoriais pode ter efeitos tanto promotores quanto inibitórios sobre a progressão do câncer. No entanto, sua influência específica na formação de metástases pulmonares ainda não foi totalmente elucidada. Compreender essa interação é fundamental, uma vez que a disseminação metastática é responsável pela maioria das mortes relacionadas ao câncer (CHAFFER; WEINBERG, 2011; SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013)

Nossa equipe tem explorado o papel dos neurônios sensoriais em modelos murinos de melanoma, revelando resultados promissores que sugerem um efeito antitumoral quando esses neurônios são estimulados (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021). Agora, estamos direcionando nossos esforços para entender como essa interação ocorre no contexto do câncer de mama e sua propensão à metástase pulmonar.

Ao investigar a presença e a função dos neurônios sensoriais no microambiente tumoral mamário e pulmonar, esperamos fornecer *insights* valiosos que possam abrir caminho para novas abordagens terapêuticas. Compreender melhor os mecanismos que regem a disseminação do câncer de mama, é essencial para desenvolver estratégias mais eficazes de prevenção e

tratamento, visando melhorar os resultados e a qualidade de vida dos pacientes afetados por essa doença devastadora.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Câncer de mama e metástase

O câncer de mama é uma condição que afeta a população feminina global, sendo tanto o mais comum quanto o mais letal dentre as neoplasias (SANCHO-GARNIER; COLONNA, 2019). Atualmente, o câncer de mama feminino é reconhecido como o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado em escala mundial (IARC, 2020). Somente no ano de 2020, aproximadamente 2,3 milhões de mulheres receberam o diagnóstico dessa enfermidade, resultando em aproximadamente 685 mil óbitos, consolidando-o como a causa de morte mais comum entre as mulheres. As estimativas epidemiológicas para o ano de 2040 representa um aumento extremamente significativo de novos casos e da mortalidade mundial pelo câncer de mama. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que no ano de 2024 serão 3,19 milhões de novos casos e 1,04 milhões de mortes em decorrência do câncer de mama, sendo considerados todos os sexos e idades (IARC, 2020). No Brasil, o câncer de mama é responsável por ser a principal causa de óbito relacionado ao câncer em mulheres em todas as regiões do país, com exceção da região Norte, onde o câncer de colo do útero ocupa essa posição (INCA, 2020). Para o ano de 2021 foi estimado um total de 66.280 novos casos da doença (INCA, 2020).

Cerca de 10 a 15% das pacientes com câncer de mama enfrentam uma forma agressiva da doença, apresentando metástases em órgãos distantes em até 3 anos após o diagnóstico inicial. É notável que, em alguns casos, manifestações metastáticas também podem surgir em tecidos distantes 10 anos ou mais após a detecção do tumor primário (WEIGELT; PETERSE; VAN 'T VEER, 2005). Uma vez disseminadas, as células do câncer de mama têm a capacidade de formar lesões metastáticas em diversos tecidos e órgãos. Os locais de maior recorrência para metástases nesse tipo de câncer incluem: os ossos, pulmões e fígado (LEE, 1983). Aproximadamente 60% dos pacientes com câncer de mama em estadiamento metastático, apresentam essa metastatização para o pulmão ou para o osso (UROOJ; WASIM; MUSHTAQ; SHAH *et al.*, 2020).

Os cânceres mamários são originados nas unidades lobulares do ducto terminal da mama e são classificados de acordo com suas características histológicas e moleculares, a fim de melhor direcionar uma conduta terapêutica. Os subtipos histológicos do câncer de mama mais

frequentes são separados em dois grandes grupos, o grupo pré-invasivo e o grupo invasivo. O grupo pré-invasivo é composto pelo subtipo denominado carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e pelo carcinoma lobular *in situ* (CLIS). O CDIS possui como característica se espalhar pelos ductos, promover uma distorção da arquitetura ductal e pode progredir para câncer invasivo unilateralmente, enquanto o CLIS não promove distorção da arquitetura ductal, pode ser bilateral e se apresenta mais como um fator de risco ao invés de precursor. Já o grupo invasivo é composto pelo subtipo denominado carcinoma ductal sem tipo especial (NST) e carcinoma lobular (CLI). O NST é caracterizado por ser uma evolução do CDIS pré-invasivo, estimula uma resposta fibrosa, produzindo uma massa que se metastatiza por via linfática e sanguínea. Enquanto o CLI, apresenta células tumorais isoladas, gerando resposta fibrosa mínima e realizando preferencialmente metástase por vísceras (HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT *et al.*, 2019).

A classificação empregada na prática clínica leva em consideração a análise histológica em conjunto com a expressão de proteínas padronizadas como marcadores. As proteínas avaliadas são o receptor de estrogênio (RE), o receptor de progesterona (PR), o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e o marcador de proliferação Ki67. A partir dessa avaliação é possível classificar o câncer de mama em cinco subtipos histológicos moleculares: 1) o triplo negativo (RE⁻ / RP⁻ / HER2⁻ / alto índice de Ki-67); 2) o HER2 enriquecido não luminal (RE⁻ / RP⁻ / HER2⁺ / alto índice de Ki-67); 3) Luminal B HER2⁺ (RE⁺ / HER2⁺ / alto índice de Ki-67 / a expressão de RE e RP são inferiores ao luminal A); 4) Luminal B HER2⁻ (RE⁺ / HER2⁻ / alto índice de Ki-67 / a expressão de RE e RP são inferiores ao luminal A); e, 5) Luminal A (RE⁺ / RP⁺ / HER2⁻ / Baixo índice de Ki-67) (HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT *et al.*, 2019).

No carcinoma ductal invasivo da mama, o subtipo luminal B do tipo basal e o subtipo triplo-negativo p53 negativo são os mais frequentemente associados a metástases pulmonares (GAO; DU; CONG; LIU, 2009; SMID; WANG; ZHANG; SIEUWERTS *et al.*, 2008).

Nas metástases pulmonares do câncer de mama, as consequências são extremamente graves. Os sintomas mais comuns que afetam a qualidade de vida e principalmente a sobrevivência do paciente incluem tosse persistente, dor torácica expectoração de sangue e derrame pleural (JIN; HAN; SIEGEL; CUI *et al.*, 2018). Estes sintomas podem variar em intensidade podendo levar a complicações adicionais, como infecções respiratórias frequentes e deterioração da função pulmonar ao longo do tempo. Caracterizando a importância de estudos

que busquem compreender, prevenir e tratar a metástase do câncer de mama no tecido pulmonar.

2.2. Microambiente Tumoral

O microambiente tumoral é um componente fundamental na progressão e disseminação do câncer. Estudos recentes têm destacado a interação complexa entre as células neoplásicas e os diversos tipos celulares presentes nesse ambiente, como os macrófagos associados ao tumor (TAMs), fibroblastos associados ao tumor (CAFs), linfócitos T e B, células T reguladoras (Treg), células dendríticas, células natural killer (NK), pericitos e células supressoras derivadas da mielóide (MDSCs) (VLADIMIROVNA; SOSUNOVA; NIKOLAEV; NENASHEVA, 2016). As MDSCs são reguladoras chave da resposta imune no câncer, inibindo a ativação de linfócitos T, recrutando células T-reg supressoras da resposta imune e mantendo subpopulações de células tumorais com fenótipo de células-tronco, promovendo angiogênese, invasão e metástase. entre outros. Essas células desempenham papéis cruciais na promoção da carcinogênese e na resposta imunológica antitumoral. Assim, compreender a dinâmica dessas interações no microambiente tumoral é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas visando combater o câncer de forma mais eficaz (OSTRAND-ROSENBERG; FENSELAU, 2018; VLADIMIROVNA; SOSUNOVA; NIKOLAEV; NENASHEVA, 2016).

Outra população importante que vem sendo estudadas nas últimas décadas no microambiente tumoral são as células linfóides inatas (ILCs). As células linfóides inatas (ILCs) desempenham um papel crucial no desenvolvimento dos tecidos linfóides associados à mucosa, promovendo rápida resposta efetora à alterações no microambiente causadas por diversos insultos patogênicos, atuando de forma similar ao subconjunto de células T auxiliares (Th), (CONSTANTINIDES; MCDONALD; VERHOEF; BENDELAC, 2014). As ILCs são principalmente localizadas em barreiras mucosas como o pulmão, a mucosa intestinal e a pele (FUCHS; COLONNA, 2013). Apesar de não serem caracterizadas por marcadores de linhagem imunológica convencionais, as ILCs foram inicialmente divididas em três grupos principais com base na produção de citocinas associadas aos subconjuntos de células T auxiliares, Th1, Th2 ou Th17 (SPITS; ARTIS; COLONNA; DIEFENBACH *et al.*, 2013). O grupo ILC2 compreende exclusivamente as células ILC2 que atuam similarmente a Th2, enquanto o grupo ILC1 inclui células ILC1 e células NK que podem desempenhar papéis semelhantes a Th1. Já o grupo ILC3 é composto por células ILC3 e células indutoras de tecido linfóide (LTi) que podem atuar similarmente ao grupo Th17 (MONTALDO; VACCA; MORETTA; MINGARI, 2014).

Entre as populações de ILCs, as ILC3 e ILC2 são as populações mais comumente associadas a progressão tumoral e a um pior prognóstico (TIAN; VAN VELKINBURGH; WU; NI, 2016). As ILC3s atuam regulando positivamente citocinas como IL-1 β IL-6, TNF- α , IL-11, IL-17 IL-22 e IL-23, com capacidade de orquestrar quadros de inflamação crônica (BARRON; CONNOLLY; SHARP; BENNETT *et al.*, 2011). A presença das ILC3s no câncer de mama está associada a progressão tumoral (IRSHAD; FLORES-BORJA; LAWLER; MONYPENNY *et al.*, 2017; VOIGT; MAY; GOTTSCHLICH; MARKOTA *et al.*, 2017), devido a sua alta capacidade de produzir IL-17 / IL-22, tornando o microambiente tumoral favorável para a progressão e invasão metastática (CASTILLO-GONZALEZ; VALLE-NOGUERA; GOMEZ-SANCHEZ; XIA *et al.*, 2022; LUO; YANG; LIU; DING, 2024; ZHANG; LIU; GAO; SHAO *et al.*, 2020). As ILC2s também são correlacionadas a progressão do câncer de mama. Um estudo demonstrou que a transferência adotiva de ILC2s pulmonares em camundongos portadores de câncer de mama 4T1, desencadeou aumento na quantidade de nódulos metastáticos pulmonares e reduziu significativamente a sobrevida dos camundongos (ZHAO; ZHU; WANG; LIU *et al.*, 2021). Além disso, outro estudo caracterizou que as ILC2s ativam MDSCs através de IL-13, o que favoreceu a imunossupressão no micromambiente tumoral, potencializando drasticamente a formação de metástases do câncer de mama para o pulmão (ITO; AKAMA; SATOH-TAKAYAMA; SAITO *et al.*, 2022; ZHAO; ZHU; WANG; LIU *et al.*, 2021).

2.3. Microambiente metastático pulmonar

O pulmão apresenta-se como um dos principais órgãos acometido pela metástase do câncer de mama. O tecido pulmonar humano possui aproximadamente 300 milhões de alvéolos que medem aproximadamente 0,25mm de diâmetro, cada alvéolo possui aproximadamente 1000 capilares garantindo a hematose, sendo que o diâmetro desses capilares pode variar de 2 a 15 μ m. No processo inflamatório, devido ao estreito diâmetro dos capilares pulmonares, foi observado por micrografia eletrônica, que células polimorfonucleares que apresentam o diâmetro de 6 a 8 μ m acabam se deformando para conseguirem passar pelos capilares alveolares (BURNS; SMITH; WALKER, 2003). Alguns estudos que avaliaram vários tipos tumorais, incluindo tumores de mama, relataram que o diâmetro médio de uma célula neoplásica circulante é de 15 a 25 μ m (HAO; WAN; XIA; ZOU *et al.*, 2018), tamanho esse, quase 3 vezes o de uma célula polimorfonuclear. Assim no contexto microcirculatório alveolar, a anatomofisiologia do pulmão metastático pode favorecer a adesão das células neoplásicas e

consequentemente seu extravasamento para o tecido pulmonar (SHARMA; SHARMA; KHAKET; DUTTA et al., 2017).

Entretanto, a afinidade das células tumorais de mama para o pulmão, pode não estar relacionado a um microambiente pulmonar estruturalmente favorável para sua migração, mas sim relacionado a um microambiente pulmonar constitutivamente favorável, tendo em vista que nesse tecido reside extensas populações celulares. Além disso, esse tecido possui uma alta capacidade de promover sinalizações inflamatórias e resolutivas, já que fisiologicamente, se encontra constantemente em contato com o meio externo durante a inspiração (GARNER; DE VISSER, 2020).

Uma extensa população residente no tecido pulmonar são os macrófagos, eles são responsáveis por garantir a homeostasia do tecido pulmonar através da identificação, fagocitose, sinalização e remodelação cicatricial do pulmão. A literatura ao longo dos anos tem demonstrado que os macrófagos participam do desenvolvimento tumoral, sendo que a alta densidade populacional de macrófagos está correlacionada ao pior prognóstico dos pacientes (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002). Além disso, a alta densidade de macrófagos está fortemente correlacionada com a baixa sobrevida dos pacientes nos cânceres de tireoide, pulmão e hepatocelular (CHEN; LIN; YAO; YUAN et al., 2005; RYDER; GHOSSEIN; RICARTE-FILHO; KNAUF et al., 2008; ZHU; ZHANG; ZHUANG; ZHU et al., 2008).

Os macrófagos são células que pertencem à linhagem fagocítica mononuclear (POLLARD, 2009). Estes são identificados por características fenotípicas específicas e pela expressão de um painel de marcadores, embora nenhum destes marcadores seja exclusivo dessa linhagem celular (GORDON; TAYLOR, 2005). As classificações para identificar subtipos de macrófagos se baseiam na atuação dessas células em respostas imunológicas. Por exemplo, entende-se por macrófagos "ativados", os que respondem principalmente às células T auxiliares do tipo I (Th1) em situações de infecção. Esses macrófagos são ativados por interferon gama e receptores Toll-like (TLRs), e caracterizam-se por expressar altos níveis de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, interleucina (IL)-12 e fator de necrose tumoral α (TNF α). Eles também produzem espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO) e possuem capacidade de destruir patógenos e células infectadas. Por outro lado, os macrófagos "ativados alternativamente" respondem a sinais como IL-4 e IL-13, estando envolvidos em respostas do tipo Th2, como imunidade humoral e cicatrização de feridas (GORDON, 2003; POLLARD, 2009). No câncer Mantovani e colaboradores descreveram que os macrófagos de perfil "ativado" chamados M1 que respondem a via Th1, sofrem uma mudança para o perfil

“alternativamente ativado”, também descrito como M2. Os macrófagos polarizados em M2 por sua vez respondem a via Th2 (MANTOVANI; SICA, 2010).

Embora já tenha sido descrito que o ácido láctico derivado de células neoplásicas dentro do microambiente tumoral promova a polarização de macrófagos em M2 pró-tumorais (COLEGIO; CHU; SZABO; CHU et al., 2014), uma das principais sinalizações associadas a um pior prognóstico, presente em uma gama de tipos tumorais, incluindo o câncer de mama, é a superexpressão da quimiocina CCL2 (MANTOVANI; SICA, 2010). A superexpressão de CCL2 induzida pelo tumor promove o recrutamento de monócitos e sua diferenciação em macrófagos polarizados M2, dentro do microambiente tumoral, através da via CCL2/CCR2, resultando na formação dos chamados macrófagos associados ao tumor (TAMs). Os TAMs atuam ativamente na progressão tumoral, secretando citocinas proangiogênicas e imunossupressoras, favorecendo diretamente o crescimento e a metástase tumoral (NOY; POLLARD, 2014). Ainda no contexto do câncer de mama, estudos utilizando camundongos deficientes para população de macrófagos, observaram uma drástica redução da carga metastática (CONDEELIS; POLLARD, 2006; LIN; NGUYEN; RUSSELL; POLLARD, 2001). Além disso, estudos recentes demonstraram a importância da via de sinalização CCL2/CCR2 na metástase do câncer de mama, ao caracterizarem que a inibição do recrutamento de macrófagos por essa via de sinalização resultou em uma drástica redução da metástase do câncer de mama para o pulmão (BONAPACE; COISSIEUX; WYCKOFF; MERTZ et al., 2014; MEI; TANG; ZHOU; XUE et al., 2023; ZHANG; WANG; GAO; CHEN et al., 2018).

A atuação dos macrófagos diretamente no tumor primário, através da sinalização da via CCL2/CCR2, pode promover alterações no microambiente pulmonar, já que esse tecido possui uma extensa população de macrófagos residentes que podem sofrer polarização M2 e iniciar uma sinalização CCL2/CCR2 independente, formando um microambiente pré-metastático e favorecendo a adesão de células neoplásicas circulantes. Além disso, recentemente foi descrito que os tumores de mama invasivos provocam mudanças nos níveis de proteínas estruturais, enzimas de degradação e proteínas de processamento da matriz extracelular (MEC) nos pulmões pré-metastáticos, em parte, mediados por fibroblastos pulmonares. Isso sustenta a hipótese de que exista um nicho pré-metastático e as alterações prévias da MEC promovem a criação de um ambiente propício para a disseminação de células cancerígenas, com seu envolvimento evoluindo dinamicamente durante o processo de metástase (CAI; TRESSLER; CHENG; SONKAR et al., 2023).

2.4. Relações neuroimune no câncer e no pulmão

Durante um longo período, o sistema nervoso foi considerado um coadjuvante no contexto do câncer de mama (BOILLY; FAULKNER; JOBLING; HONDERMARCK, 2017), sendo a invasão perineural (PNI) uma das únicas associações entre as células cancerígenas da mama e o sistema nervoso (LI; ZHAO; ZHU; LIU *et al.*, 2023; NARAYAN; FLYNN; ZHANG; GILLESPIE *et al.*, 2021). Entretanto, novos estudos epidemiológicos e clínicos têm destacado o papel fundamental de neurotransmissores e seus receptores na regulação do câncer de mama desde o seu desenvolvimento até sua progressão (BARRON; CONNOLLY; SHARP; BENNETT *et al.*, 2011; SHAASHUA; SHABAT-SIMON; HALDAR; MATZNER *et al.*, 2017), destacando a importância de uma melhor compreensão das interações entre o sistema nervoso e o câncer de mama. Estudos em humanos conseguiram correlacionar que o uso de betabloqueadores, responsáveis por bloquear as interações da epinefrina e da norepinefrina com os receptores β -adrenérgicos (ARs), estão associados a uma redução da progressão do câncer de mama, além da melhora significativa nos desfechos clínicos dos pacientes (BARRON; CONNOLLY; SHARP; BENNETT *et al.*, 2011; MELHEM-BERTRANDT; CHAVEZ-MACGREGOR; LEI; BROWN *et al.*, 2011).

O microambiente tumoral do câncer de mama estimula a produção do fator de crescimento neural (NGF) e do fator neurotrófico derivado do cérebro, que participam diretamente da axonogênese (HONDERMARCK, 2012; PUNDAVELA; ROSELLI; FAULKNER; ATTIA *et al.*, 2015). Por sua vez, os nervos secretam neurotransmissores e fatores de crescimento, que atuam sob vias de sinalização responsáveis por regular a proliferação celular, invasão e metástase do câncer de mama (FAULKNER; JOBLING; MARCH; JIANG *et al.*, 2019). Um estudo que utilizou técnicas genéticas para manipular a inervação em camundongos com xenoinxertos de câncer de mama humano e em ratos, com tumores de mama induzidos quimicamente, descreveu que a estimulação dos nervos simpáticos acelerou o crescimento e progressão do câncer de mama, enquanto a estimulação dos nervos parassimpáticos levou a uma redução do crescimento e progressão do câncer de mama (KAMIYA; HAYAMA; KATO; SHIMOMURA *et al.*, 2019). Entretanto, estudos recentes sobre o papel dos neurônios sensoriais no câncer, destacou que a inibição quimiogénica, assim como depleção química dos neurônios sensoriais, acelerou o crescimento e a progressão do melanoma (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021; PRAZERES; LEONEL; SILVA; ROCHA *et al.*, 2020).

Esses resultados também foram observados no contexto do câncer de mama através da inativação química de neurônios sensoriais vagais TRPV1⁺ por altas doses de capsaicina, o que promoveu o aumento acentuado de metástases. Demonstrando que essa inativação influencia a progressão tumoral, devido à ausência de mediadores sensoriais, como a substância P, que é um dos neuropeptídeos que mais atuam na resposta imune antitumoral, resultando em uma diminuição da resposta imune local e sistêmica, que conseqüentemente favorecem o tumor (ERIN, 2020). Entretanto, a avaliação da atividade dos neurônios sensoriais dentro do microambiente pulmonar no câncer de mama ainda carece ser mais elucidada.

O tecido pulmonar é predominantemente inervado por neurônios sensoriais vagais, que periféricamente ingressam nos pulmões ao longo das vias aéreas ramificadas, através de nociceptores Trpv1⁺ e peptidérgicos Tac1⁺ que possuem ramos compartilhados e distintos, direcionados a musculatura lisa das vias aéreas, vasculatura, incluindo linfática e os alvéolos. A interação das terminações Trpv1⁺ com os vasos linfáticos contribui para o fluxo de células imunológicas na drenagem de fluidos, além de ter sido caracterizado a capacidade dessas terminações de regularem respostas imunes no pulmão, como a supressão de células T gama-delta residentes e supressão do recrutamento de neutrófilos durante infecções bacterianas (BARAL; UMANS; LI; WALLRAPP *et al.*, 2018). Os receptores do canal de Na⁺ dependente de voltagem 1.8 (Nav1.8) é essencialmente expresso nos prolongamentos axonais de neurônios sensoriais nociceptivos (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021), como terminais Trpv1⁺, entretanto a presença de terminais Nav1.8 no tecido pulmonar ainda não foi fenotipicamente caracterizada e sua participação no desenvolvimento tumoral mamário e na metástase para o pulmão ainda segue em aberto.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama feminino representa a forma mais frequentemente diagnosticada de câncer globalmente. Em 2020, cerca de 2,3 milhões de mulheres receberam esse diagnóstico, resultando em aproximadamente 685 mil óbitos relacionados à doença, estabelecendo-a como a principal causa de morte por câncer entre o sexo feminino (IARC 2020). A alta mortalidade e morbidade da doença refletem a importância crítica da pesquisa, prevenção e tratamento eficaz do câncer de mama, destacando a necessidade de esforços contínuos para reduzir seu impacto e melhorar os resultados para as pacientes.

O sistema nervoso exibe uma extensa distribuição em todo o organismo e desempenha um papel de destaque no contexto do microambiente tecidual. Evidências científicas têm

caracterizado que os neurônios interagem com células imunes através de citocinas, neurotransmissores e fatores de crescimento, desempenhando funções significativas em uma ampla gama de processos, tanto fisiológicos quanto patológicos, e estão presentes no microambiente tumoral. No câncer de mama estudos tem observado que a atuação do sistema nervoso simpático demonstrou estar associada à progressão do câncer, enquanto a atuação de neurônios parassimpáticos e sensoriais podem exercer um efeito inibitório sob essa progressão (AUSTIN; ELLIOTT; NICOLAOU; GRABOWSKA *et al.*, 2017; KAMIYA; HAYAMA; KATO; SHIMOMURA *et al.*, 2019).

Embora novos estudos tenham buscado compreender a atuação dos neurônios sensoriais no tumor primário, avaliar a influência desse importante componente na formação de metástases se faz extremamente relevante, tendo em vista que 90% da mortalidade relacionadas aos cânceres em geral é resultante de metástases (CHAFFER; WEINBERG, 2011; SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013).

Dados recentes da nossa equipe, utilizando modelos de camundongos geneticamente modificados, demonstraram a presença de fibras Nav1.8 dentro do microambiente tumoral do melanoma murino B16F10. Nesses estudos, foi observado que tanto a depleção quanto a inibição dos neurônios sensoriais, induziram uma progressão do melanoma, enquanto a estimulação dos neurônios sensoriais modulados, desempenhou papel antitumoral (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021; PRAZERES; LEONEL; SILVA; ROCHA *et al.*, 2020). Portanto, como o pulmão é um tecido comumente acometido por metástases e ricamente povoado por macrófagos, torna-se crucial a investigação da atuação dos neurônios sensoriais sob as populações imunes no microambiente tumoral mamário, bem como na regulação da metástase e das populações de macrófagos que compõe o microambiente pulmonar, a fim de investigar o seu impacto na progressão da doença, fornecendo a partir desse estudo um potencial fonte de novas abordagens terapêuticas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da modulação quimiogénica de neurônios sensoriais Nav 1.8 na disseminação metastática do carcinoma mamário E0771 para o pulmão.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Caracterizar a presença da neurônios sensoriais Nav1.8 no parênquima pulmonar de camundongos transgênicos Nav 1.8 Cre⁺ / TdTomato⁺;
- 4.2.2. Testar a efetividade da quimiomodulação neurosensorial em camundongos Nav 1.8 Cre⁺ / Hm3Dq⁺ em relação ao seu controle Nav 1.8 Cre⁻ / Hm3Dq⁺, através da realização de testes nociceptivos;
- 4.2.3. Avaliar a função pulmonar, através de parâmetros obtidos pela técnica de espirometria ventilatória ao final do período experimental em camundongos neuromodulados Nav 1.8 Cre⁺ / Hm3Dq⁺ em relação ao seu controle Nav 1.8 Cre⁻ / Hm3Dq⁺;
- 4.2.4. Quantificar área, perímetro e o número de focos de infiltrado inflamatório associados a metástase no pulmão de camundongos neuromodulados Nav 1.8 Cre⁺ / Hm3Dq⁺ e seus respectivos controles Nav 1.8 Cre⁻ / Hm3Dq⁺, através de coloração histológica,
- 4.2.5. Caracterizar e quantificar a população de macrófagos no pulmão de camundongos Nav 1.8 Cre⁺ / Hm3Dq⁺ e seus respectivos controles Nav 1.8 Cre⁻ / Hm3Dq⁺, previamente induzidos com carcinoma mamário, através de imunofluorescência;
- 4.2.6. Avaliar o perfil de populações linfóides inatas (ILCs), linfóides adaptativas e mieloide no microambiente tumoral de camundongos Nav 1.8 Cre⁺ / Hm3Dq⁺ e seus respectivos controles Nav 1.8 Cre⁻ / Hm3Dq⁺.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Modelos transgênicos

A fim de caracterizar a presença de fibras neurosensoriais no tecido pulmonar e avaliar a modulação quimiogenética dessas fibras, foi realizado o cruzamento de camundongos transgênicos Nav1.8-Cre obtidos da Infrafrontier (EMMA ID: 04 582) com camundongos transgênicos R26-LSL-TdTomato (número de estoque: 007914) adquiridos do Jackson Laboratory (Jax, Bar Harbor, ME). Os animais Nav1.8-Cre⁺ / TdTomato⁺ (N=2) oriundos desses cruzamentos sofrem a ação da enzima Cre recombinase e possuem a sequência genica que codifica a proteína fluorescente TdTomato. Assim a enzima Cre é expressa sob o promotor do canal de sódio dependente de voltagem 1.8 (Nav1.8), permitindo que todos os neurônios

sensoriais que possuem Nav1.8 expressem concomitantemente a fluorescência vermelha endógena.

Para a quimiomodulação dos neurônios sensoriais *in vivo*, foi utilizado a tecnologia de receptor desenhado exclusivamente para ser ativado por uma droga desenhada (DREADD). Os camundongos Nav1.8-Cre obtidos da Infrafrontier (EMMA ID: 04 582) foram cruzados com animais CAG-LSL-hM3Dq-DREADD (hM3Dq) adquiridos do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). O modelo de camundongos CAG-LSL-hM3Dq-DREADD (hM3Dq) possui um cassete loxP-stop-loxP que antecede a sequência genética que codifica o receptor muscarínico 3 (M3) humano acoplado à proteína Gq evoluído (hM3Dq). Ao cruzar esses animais com o modelo Nav 1.8-Cre, a enzima Cre Recombinase associada ao canal Nav 1.8 que está presente em neurônios sensoriais nociceptivos, promove a remoção do cassete loxP-stop-loxP (LSL) por recombinação, permitindo que o gene que codifica o receptor hM3Dq acoplado à proteína Gq seja especificamente expresso nos neurônios sensoriais que possuem o canal Nav1.8. O hM3Dq é um receptor mutante acoplado à proteína G que induz a via canônica Gq após receber a ligação da droga N-óxido de clozapina- (CNO). Assim, a estimulação dos neurônios sensoriais pode ser induzida quimicamente pela administração de CNO. O grupo neuromodulado foi composto de fêmeas Nav1.8-Cre⁺/hM3Dq⁺ (n=7), enquanto o grupo controle foi composto de fêmeas Nav1.8-Cre⁻/hM3Dq⁺ (N=7), já que os animais que não possuem a sequência da Cre Recombinase não conseguem expressar o receptor hM3Dq tendo em vista que sua sequência é silenciada por um stop códon que o antecede. Todos os camundongos utilizados durante o experimento eram heterozigotos para os genes Nav1.8-Cre, TdTomato e DREADD, possuíam de 8 a 12 semanas de idade, pesavam aproximadamente 20g e estão sobre o background C57BL/6J.

5.2. Aspectos éticos.

Todos os camundongos utilizados nesse experimento foram alojados em biotério no Departamento de Patologia da UFMG, sob um ciclo de luz controlado (ciclo claro/escuro de 12:12 h) e alimentados *ad libitum*. Todos os cuidados com os animais e procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais (CEUA - Protocolo: 69/2023), de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.3. Fenotipagem dos animais Nav1.8⁺/TdTomato⁺

Para caracterizar a presença do fenótipo *TdTomato* nas fibras sensoriais Nav1.8^{cre}, um pequeno fragmento da orelha de animais oriundos do cruzamento entre os dois genes foi coletado. Posteriormente esse fragmento foi colocado em lâmina histológica e montado com uma lamínula. O tecido foi analisado através do microscópio de fluorescência (EVOS® FL Cell Imaging Systeme), e os animais que possuíam os nervos sensoriais da orelha marcados pela fluorescência TdTomato foram utilizados para caracterização experimental.

5.4. Genotipagem dos grupos experimentais DREADD

Para a seleção dos grupos neuromodulado e controle, os filhotes obtidos do cruzamento entre camundongos Nav1.8^{cre} com camundongos DREADD-Hm3Dq foram submetidos a genotipagem. Um pequeno fragmento tecidual de cada filhote previamente identificado foi utilizado para realização de extração do DNA. Para essa extração o fragmento tecidual coletado foi lisado em 75ul de solução de lise alcalinizada e submetido a alta temperatura (95°C em 1000rpm no equipamento termo bloco por 1 hora); posteriormente foi adicionado 75ul de solução neutralizante ácida e as amostras foram centrifugadas durante 5min, a 4°C em 4000rpm. Ao final da etapa de centrifugação, 70ul do sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo tubo estéril e armazenado em freezer -20°C até a realização da PCR. Para a realização da PCR convencional é utilizado 200ng de DNA extraído. Para a identificação dos genes alvos foram utilizadas as seguintes sequencias de primers: Cre (AAC ATG CTT CAT CGT CGG) e Hm3Dq (CGC CAC CAT GTA CCC ATA C). Após a PCR convencional, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, posteriormente as bandas resultantes da amplificação de cada gene foram reveladas em transluminador através da ação luminosa do brometo de etídio e comparadas às bandas do controle positivo de cada gene. Para análise qualitativa foram considerados Hm3Dq⁺, camundongos que apresentaram amplificação das bandas WT (297bp) e mutante (200bp) de acordo com o controle. Enquanto foi considerado Nav1.8Cre⁺ os camundongos que apresentaram amplificação da banda mutante (500bp). Os animais positivos para o gene Cre e Hm3Dq são passíveis de serem neuromodulados, enquanto os animais positivos apenas para o gene Hm3Dq, possui a sequência silenciada, e não possuem a expressão do receptor Hm3Dq, sendo utilizados como controle.

5.5. Cultivo *in vitro*

As células de carcinoma mamário murino E0771 foram fornecidas pelo Laboratório de Imunometabolismo e Exercício da Universidade de São Paulo (USP). Essas células foram cultivadas a 37°C em 5% de CO₂ com Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM),

suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 10 ml/L de penicilina e 100X de estreptomicina. Esse é um modelo de células epiteliais isoladas da glândula mamária de camundongos C57BL6 que possuíam carcinoma mamário desenvolvido espontaneamente.

5.6. Indução do carcinoma mamário e plano experimental

Para o desenvolvimento do carcinoma mamário, 14 camundongos fêmeas com 8 a 10 semanas de idade, sendo 7 Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ (neuromodulado) e 7 Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (controle) foram utilizados conforme figura 1A. No dia 1 experimental, para realização do transplante ortotópico do carcinoma mamário, todos os camundongos foram previamente anestesiados através de Xilasina e Cetamina, e posteriormente foram submetidos ao inóculo de células E0771 na concentração de 1×10^6 células diluídas em 100ul de PBS 1x por via subcutânea na almofada de gordura da 4ª glândula mamária esquerda. A administração de uma dose do N-Óxido de Clozapina (CNO) foi realizada diariamente durante todo o experimento, seguindo horário padronizado, iniciando no 1º dia e se mantendo até o 28º dia experimental ao qual foi realizado a eutanásia. O comprimento (L) e a largura (W) do tumor foram medidos através de um paquímetro a cada dois dias para determinar o volume do tumor (V), utilizando a fórmula $V = 0,5 \times (L \times W^2)$ do 10º ao 28º dia (GAST; SILK; ZAROUR; RIEGLER et al., 2018).

No 9º dia experimental os animais foram submetidos aos testes nociceptivos *Randall-Selitto* e *Tail Flick* para testar a efetividade da modulação quimiogenética. No 27º dia experimental os testes nociceptivos foram repetidos, a fim de validar que modulação tenha ocorrido diariamente até o final do experimento.

Ao final do experimento, no 28º dia após o inóculo os animais previamente anestesiados foram submetidos a técnica de espirometria e posteriormente foram eutanasiados por overdose anestésica (Fig. 1B).

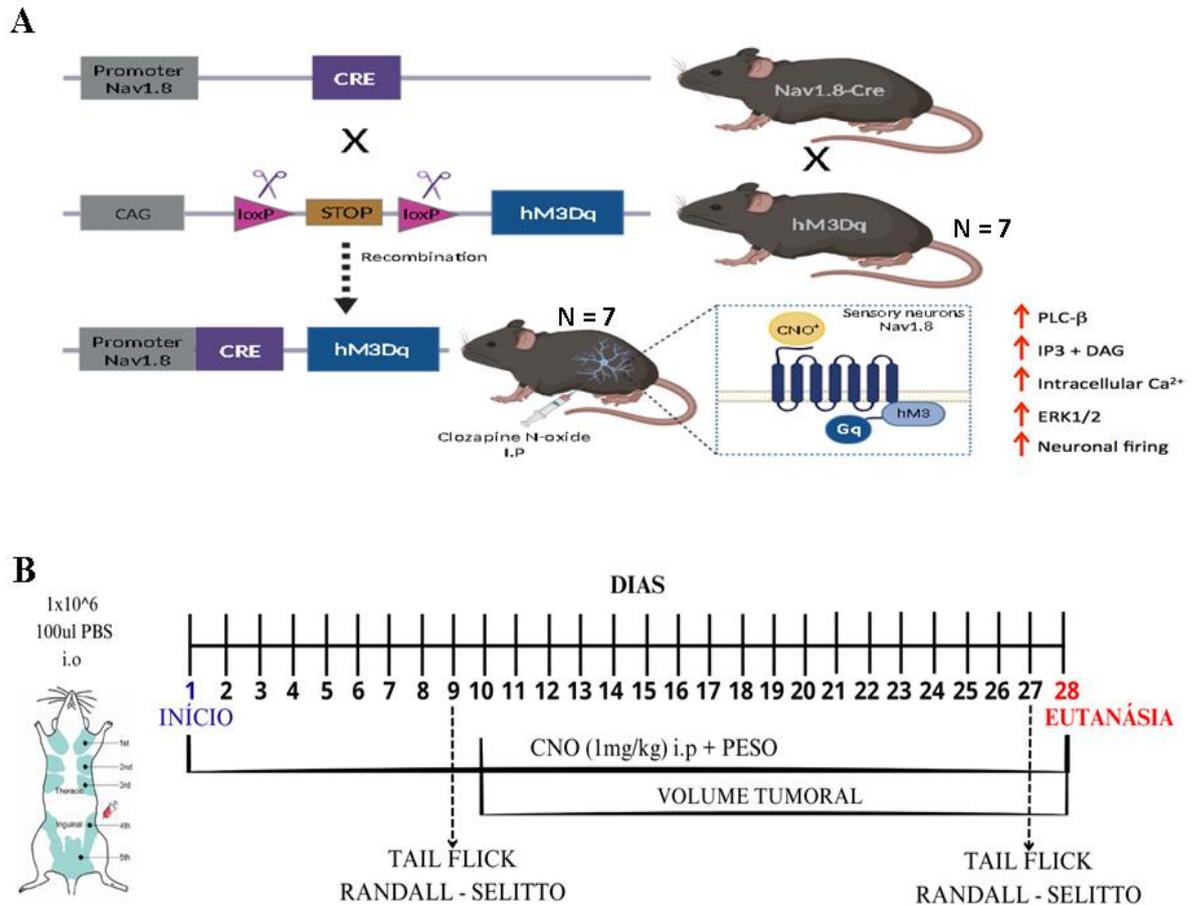


Figura 1. Cruzamento e plano experimental. Figura representativa do cruzamento entre os camundongos Nav1.8Cre x CAG-LSL-hM3Dq, seguida da ação da recombinase Cre dando origem ao camundongo Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ (A). Plano experimental (B).

5.7. Tratamento com N-óxido de Clozapina

Para promover a hiperativação neurosensorial foi administrado o N-óxido de Clozapina (CNO) que é o ligante do receptor DREADD HM3Dq. O CNO foi aplicado na concentração de 1 mg/kg diluído em 100ul de solução salina, no mesmo horário, por via intraperitoneal usando uma agulha de calibre 25 diariamente (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI et al., 2021). A primeira administração do CNO aconteceu 2 hrs após o inóculo das células E0771 (no dia 1), sendo administrado uma dose diariamente até o dia da eutanásia (28º dia). Para testar o efeito da neuromodulação sensorial na progressão do carcinoma mamário, os animais Nav1.8-Cre⁺/hM3Dq⁺ (neuromodulado) e os camundongos Nav1.8-Cre⁻/hM3Dq⁺ (controle) receberam o CNO na mesma concentração (1mg/kg) e nos mesmos horários dos animais tratados (Fig. 1B).

5.8. Teste Nociceptivo

Com o objetivo de verificar a eficácia da hiperativação dos nervos sensoriais foram realizados testes comportamentais para mensurar o aumento das respostas térmicas e mecânicas dos camundongos em dois momentos experimentais (9º e 27º dia do experimento), realizados 15 minutos após a administração do CNO em cada camundongo, dos respectivos grupos. Para avaliar a resposta aumentada dos nervos sensoriais ao estímulo térmico foi realizado um método conhecido como “teste de movimentação da cauda” (*Tail Flick*) em que a cauda do camundongo é posicionada em uma plataforma aquecida por uma resistência e o tempo de retirada da cauda, de forma espontânea, após o estímulo é quantificado (PACHECO; ROMERO; DUARTE, 2019). No teste *Tail Flick*, uma fonte de calor foi aplicada a 2 cm da ponta da cauda do camundongo.

Para avaliar a resposta aumentada dos nervos sensoriais ao estímulo mecânico foi realizado o teste de *Randall-Selitto*. Nesse teste foi utilizado um analgesimêtro equipado com um dispositivo de pressão em forma de cone, cuja extremidade é arredondada, para aplicar uma força gradual na pata traseira (ANSELONI; ENNIS; LIDOW, 2003; RANDALL; SELITTO, 1957). Ou seja, por meio do teste *Randall-Selitto* foi observado que o limiar de peso aplicado até a retirada da pata nos camundongos. O limiar nociceptivo foi determinado em gramas (g) de peso no teste *Randall-Selitto* e em segundos (s) de tempo no teste *Tail Flick* necessários para obter a resposta nociceptiva.

5.9. Avaliação da função pulmonar

Para a avaliação da função pulmonar, logo após a anestesia os camundongos foram traqueostomizados. Para tanto, a traqueia foi exposta removendo-se, cuidadosamente, a glândula submaxilar e a camada muscular que envolve a traqueia. Uma pequena incisão foi feita na traqueia para permitir a entrada do cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8 mL de espaço morto) e os animais foram colocados em um plestimógrafo conectado a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, Wilmington, North Carolina USA). Uma vez no plestimógrafo, os animais foram submetidos a uma frequência de respiração média de 160 inspirações por minuto até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração (VANOIRBEEK; RINALDI; DE VOOGHT; HAENEN et al., 2010). Sob ventilação mecânica, foi realizado à mensuração da complacência dinâmica (C_{dyn}) e da resistência pulmonar (LR) por meio do teste de resistência e complacência seguindo os princípios da lei de Boyle (WEST, 1999). A complacência estática e a capacidade inspiratória (CI) foram avaliadas mediante a realização da manobra quasistática de pressão-

volume, na qual os pulmões foram inflados a uma pressão padrão de +30 cmH₂O e, em seguida, exalados lentamente até atingir uma pressão negativa de -30 cmH₂O. A complacência estática foi determinada a uma pressão de +10 cmH₂O.

Adicionalmente, realizou-se a manobra de volume de fluxo rápido, na qual os pulmões foram inflados inicialmente a +30 cmH₂O, em seguida, submetidos a uma pressão altamente negativa para promover a expiração até -30 cmH₂O. Durante essa manobra, foram registrados a capacidade vital forçada (FVC) que representa o volume de ar total que o pulmão é capaz de inspirar e expirar (capacidade inspiratória, volume corrente e volume expiratório forçado em 20 (FEV_{20ms}) e 50 (FEV_{50ms}) milissegundos.), com exceção apenas do volume residual. Manobras consideradas abaixo do padrão ideal foram excluídas, sendo que, para cada teste em cada camundongo foram realizadas no mínimo três manobras aceitáveis a fim de obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos. A disfunção mecânica respiratória foi avaliada conforme protocolos descritos previamente na literatura (CAMPA; SILVA; MARGARIA; PIRALI et al., 2018; INSUELA; DALEPRANE; COELHO; SILVA et al., 2015; RUSSO; SAVINO; MIROLO; BURACCHI et al., 2018).

5.10. Coleta das amostras

Após a espirometria seguida de eutanásia, o lavado bronco alveolar (BAL) foi realizado com o objetivo de recuperar os leucócitos presentes no espaço alveolar. A traqueia exposta dos animais foi canulada com um cateter de polipropileno de 1,7mm. O lavado foi realizado pela injeção de duas alíquotas de 1 mL de tampão salina-fosfato estéril (PBS 1X), injetadas e recolhidas 3 vezes cada, obtendo-se aproximadamente 2,0 ml de volume final recuperado do lavado. O líquido coletado foi centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos a 4°C formando um pellet de células que foi utilizado para contagem total e diferencial de leucócitos. O sobrenadante foi congelado para posterior análises. O pellet do BAL foi ressuspensionado em 100 µL de PBS 1x e diluído 10 vezes em uma solução de Turk. Dessa solução de células foi colocado 10 µL na câmara de Neubauer e, então, realizada a contagem total de leucócitos na objetiva de 40X. após a contagem as amostras foram centrifugadas novamente e ressuspensas em meio DMEM incompleto para análises posteriores de populações imunes através de citometria de fluxo.

O pulmão esquerdo dos camundongos foram coletados para as análises histológicas, foram fixados com paraformaldeído 4% pH=7,4 durante 2 horas (4°C), em seguida as amostras foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x, colocadas em solução de sucrose diluída em PBS 1x nas concentrações de 10% por 30 minutos, 20% por 30

minutos, 30% por 48 horas em 4°C. Após esse período as amostras foram congeladas em OCT *TissueTek* utilizando isopentano (2-metilbutano, Sigma cat. M32631).

Os lóbulos superior e mediano do pulmão direito foram coletados em 1ml de trizol e foram armazenados na temperatura de -80°C para análises posteriores de transcrição gênica por RTqPCR. Os lóbulos inferior e pós-cava do pulmão direito foram coletados e imediatamente congelados a -80°C para análises posteriores de citocinas, através da técnica Cytometric Bead Array (CBA). O tumor primário e outros tecidos como fígado, baço e fêmur também foram dissecados para outras análises independentes desse trabalho.

5.11. Análises teciduais

O pulmão previamente emblocado foi seccionado na espessura de 8 µm e 12 µm em criostato (Leica) e colocados em lâminas gelatinizadas para realização da coloração por Hematoxilina & Eosina (HE) e marcação de imunofluorescência, respectivamente.

Para realização dos ensaios de imunofluorescência as amostras foram incubadas em tampão de bloqueio (4% BSA + 0,5% de triton X-100 diluídos em PBS 1x) durante 1h30min a temperatura ambiente (T.A). Em seguida, foi utilizado o anticorpo pan-macróforo anti-mouse F4/80 conjugado com PE (eBioscience 12-4801-82), diluído em tampão de bloqueio e aplicado na concentração de 1:100. As secções teciduais com o anticorpo foram incubadas overnight (4°C). No dia seguinte, o anticorpo foi removido e as amostras lavadas três vezes com PBS 1x com intervalo de 5 minutos entre cada lavagem. Em seguida, os cortes foram marcados com DAPI (1µg/mL, Invitrogen™) por 10 minutos em T.A. Ao final, as amostras foram lavadas três vezes com PBS 1x e as lâminas foram fechadas utilizando glicerol a 50%, diluído em PBS 1x.

Para obtenção das imagens por microscopia confocal, as lâminas marcadas por imunofluorescência foram visualizadas nos microscópios de fluorescência confocal da Carl Zeiss (LSM 880 e Apotome) registradas utilizando o programa ZEN 3.4. Para a caracterização da presença de fibras Nav1.8 no pulmão, foram capturadas 10 fotos em campos aleatórios no Carl Zeiss Apotome utilizando uma lente objetiva em aumento de 20x, para as demais marcações foram capturadas 10 fotos em campos aleatórios no Carl Zeiss LSM 880 utilizando uma lente objetiva em aumento de 40x. Para análises da quantificação do marcador pan-macróforo anti-mouse F4/80 (eBioscience 12-4801-82) utilizado foi empregado o software Image J (FIJI v.1.53c) na opção cell counter. O critério adotado na contabilização foi a presença de colocalização do marcador alvo F4/80 e o corante fluorescente DAPI que cora o núcleo celular.

Para obtenção das imagens por microscopia de luz, as lâminas coradas em H&E foram visualizadas no microscópio de luz Motic BA310 para cada lâmina, 20 campos aleatórios foram capturados na objetiva de 20x por meio de uma câmera acoplada ao microscópio.

5.12. Citometria de Fluxo

Um fragmento do tumor mamário dos camundongos foram igualmente coletados após a eutanásia. As amostras tumorais foram cortadas em pedaços menores e incubadas por 90 minutos em 1 mL de meio DMEM (GIBCO) sem soro fetal bovino (SFB) contendo 62,5 µg/mL de liberase TL (Roche) e 0,5 mg/mL de desoxiribonuclease I (Sigma Aldrich). Após este período foi adicionado mais 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% SFB por amostra. As amostras foram então maceradas, e o homogenato centrifugado a 400 xg por 10 minutos a 4°C. O lavado broncoalveolar (BAL) coletado e contado seguiu os procedimentos descrito no tópico anterior 5.10. seguindo para citometria de fluxo juntamente assim como as amostras tumorais.

Posteriormente, as células tumorais e do BAL foram lavadas e mantidas por 20 minutos a 4°C com o kit para avaliação de viabilidade celular LIVE/DEAD™ (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) seguindo as especificações do fabricante junto ao anticorpo anti-Fc-γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2) e com as seguintes combinações de anticorpos monoclonais fluorescentes: Pacific Blue anti-CD11b (clone M1/70); Pacific Blue anti-CD11c (clone HL3); Pacific Blue anti-FcεR1a (clone MAR-1); BV421 anti-CD19 (clone 1D3); BV421 anti-CD16/32 (clone 93); BV510 anti-CD45 (clone 30-F11); APC-Cy7 anti-TCRβ (clone H57-597). Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS a 4°C e as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C para remoção de excesso de anticorpos, este procedimento foi repetido por três vezes. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Perm/Wash Buffer™ (BD) e marcadas por 45 minutos a 4°C com o anticorpo anti Fc-γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2) e com as seguintes combinações de anticorpos monoclonais fluorescentes: PE anti-Tbet (clone 4B10); AF488 anti-GATA3 (clone 16E10A23); PE-CF594 anti-RORγT (clone BD); AF700 anti-FOXP3 (clone 150D). Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS a 4°C e as amostras foram centrifugadas a 400 xg por 10 minutos a 4°C para remoção de excesso de anticorpos, repetiu-se este procedimento por três vezes. Então, as amostras foram coletadas e as células totais foram adquiridas para cada amostra, usando o citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD). As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA) seguindo a estratégia de gate representada na figura 2.

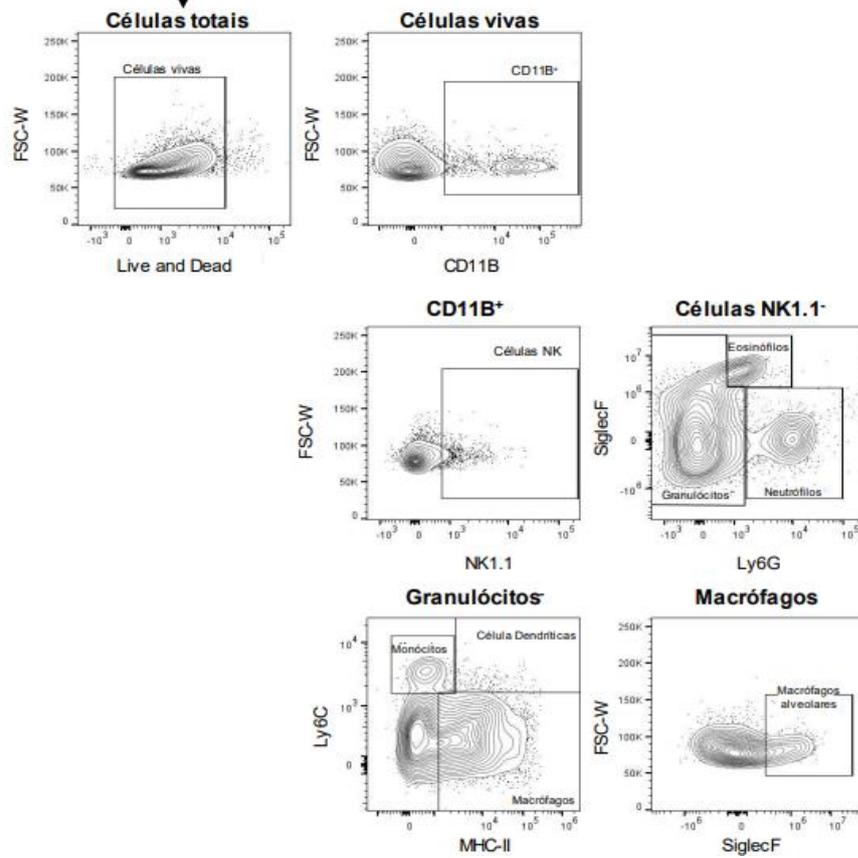
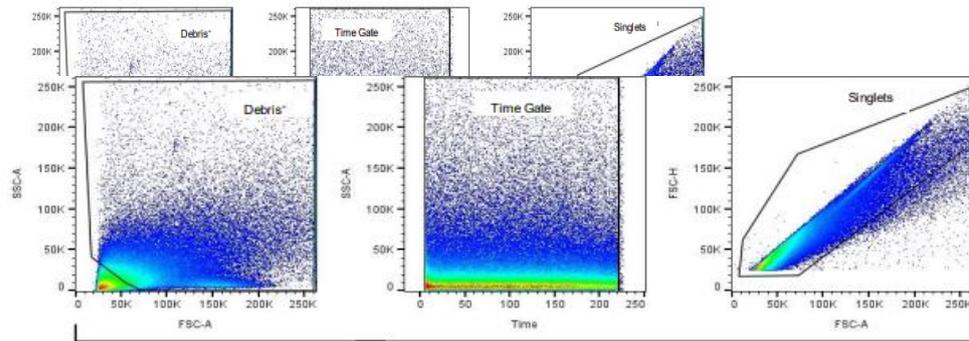
A**B**

Figura 2. Estratégias de gate. Estratégias de gate aplicadas para construção do painel linfóide inato/adaptativo (A), e para o painel mielóide (B).

5.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o *software GraphPad Prism 9.5.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA). Para verificar a normalidade dos dados, foram aplicados o teste *Shapiro-Wilk*, o teste T foi aplicado para dados paramétricos e o teste *Mann-Whitney* foi aplicado para dados não paramétricos. Para análises dos dados da curva de crescimento foi aplicado o teste *Bonferroni's multiple comparisons*. Em todos os gráficos foi aplicado previamente o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Nos gráficos de coluna, o teste *T* foi aplicado para dados paramétricos e o teste *Mann-Whitney* foi aplicado para dados não paramétricos. Em todos os casos, consideramos $p < 0,05$ como estatisticamente significativo e foram representados por Média \pm Erro da média.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização da inervação sensorial pulmonar

Para avaliar se os neurônios sensoriais Nav1.8 estão presentes no microambiente pulmonar foram utilizados camundongos Nav1.8^{cre⁺}/TdTomato⁺ que expressam a proteína fluorescente *TdTomato* nos canais NAV 1.8, conforme descrito em materiais e métodos e ilustrado na figura 3A. Após a análise do tecido pulmonar dos animais Nav1.8^{cre⁺}/TdTomato⁺ foi possível caracterizar fenotipicamente a presença de terminações neurosensoriais Nav1.8, sendo predominantemente observadas em regiões peribrônquiais (Fig. 3B).

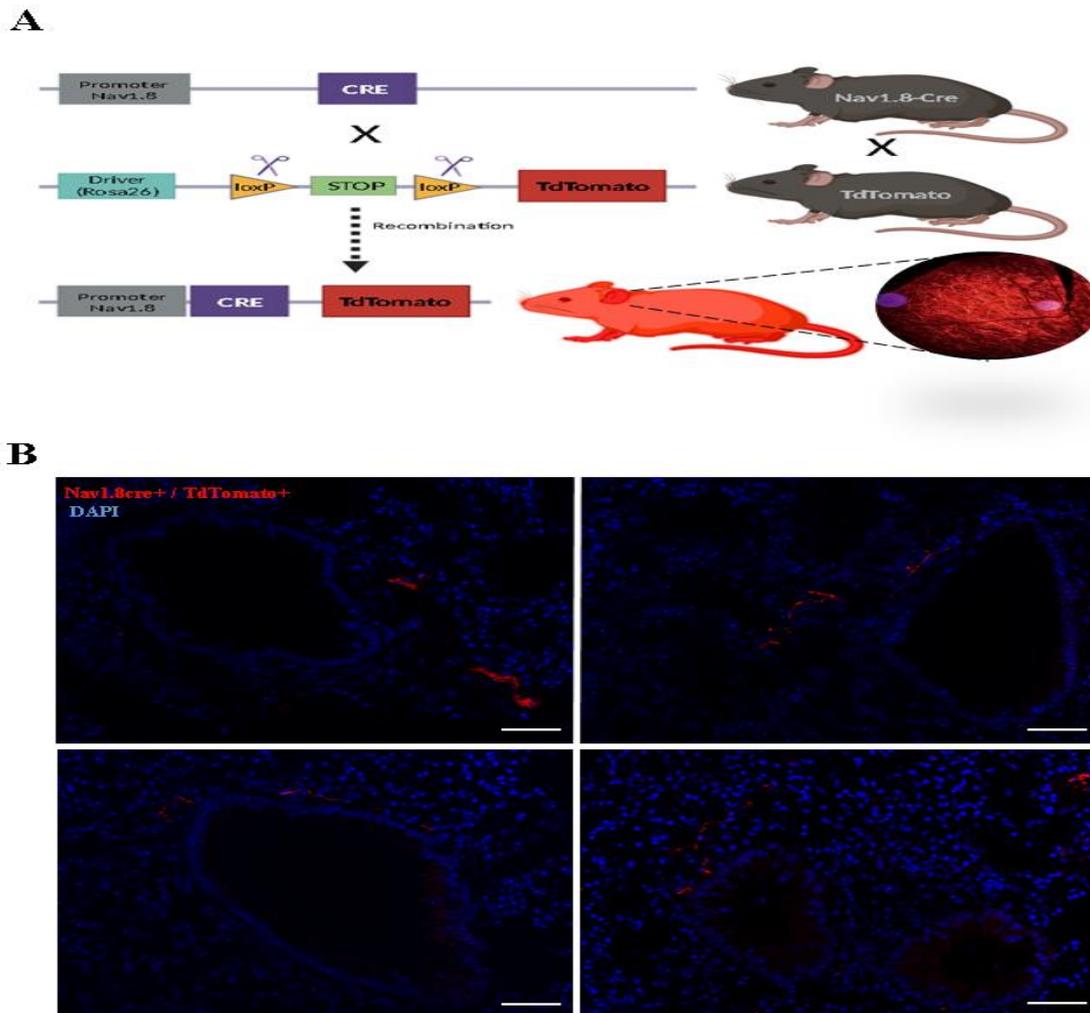


Figura 3. Imunofenotipagem de neurônios sensoriais Nav1.8 no pulmão. Esquema representativo do cruzamento de camundongos transgênicos Nav1.8Cre com camundongos R26-LSL-*TdTomato* e obtenção de camundongos com neurônios sensoriais Nav1.8Cre⁺ / TdTomato⁺ (A). Caracterização fenotípica da presença de terminações sensoriais nociceptoras Nav1.8 no microambiente pulmonar, através de fluorescência endógena. Barra de escala de 50µm (B).

6.2. Modulação quimiogênica de neurônios sensoriais Nav1.8

Para confirmar a efetividade da neuromodulação quimiogênica nos animais, foram realizados os testes nociceptivos. Os testes *Randall-Selitto* e *Tail Flick* foram realizados no 9º e 27º dia de experimento. Por meio do teste *Randall-Selitto* foi observado que o limiar de peso aplicado até a retirada da pata nos camundongos neuromodulados Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ (9º dia: 72.78±3.592 / 27º dia: 74.52±3.347) foi menor do que o limiar de peso aplicado nos camundongos do grupo controle Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (9º dia: 135.6±4.275 / e 27º dia: 123.3±1.782) nos dois dias respectivos (Fig. 4A e B). Para o teste *Tail Flick* foi observado que

o tempo de latência para a retirada da cauda dos camundongos neuromodulados Nav1.8^{cre+}/hM3Dq⁺ (9º dia: 2.522±0.03817 / 27º dia: 2.417±0.06368) foi menor do que o tempo de latência dos camundongos do grupo controle Nav1.8^{cre-}/hM3Dq⁺ (9º dia: 3.300±0.07778 / 27º dia: 3.333±0.07097) nos dois dias respectivos (Figs. 4A e B).

O volume tumoral foi mensurado diariamente através de um paquímetro do 10º ao 28º dia experimental. Foi observado que nos animais neuromodulados Nav1.8^{cre+}/hM3Dq⁺ (22º dia: 458.0±58.35 / 28º dia: 747.6±98.20) houve um aumento no crescimento do tumor mamário em relação aos camundongos do grupo controle Nav1.8^{cre-}/hM3Dq⁺ (22º dia: 277.1±39.12 / 28º dia: 496.9±47.48), no 22º e no 28º dia, respectivamente. Foto representativa com escala de 2mm (Figs. 4C e D). Após a ressecção dos tumores mamários foi observado que o peso do tumor nos camundongos neuromodulados Nav1.8^{cre+}/hM3Dq⁺ foi maior (0.5607±0.02948) em relação ao peso tumoral dos camundongos do grupo controle Nav1.8^{cre-}/hM3Dq⁺ (0.3522±0.04567), (Fig.4E). O percentual de peso corpóreo livre de tumor dos camundongos não apresentou alteração significativa entre os grupos (Fig.4F).

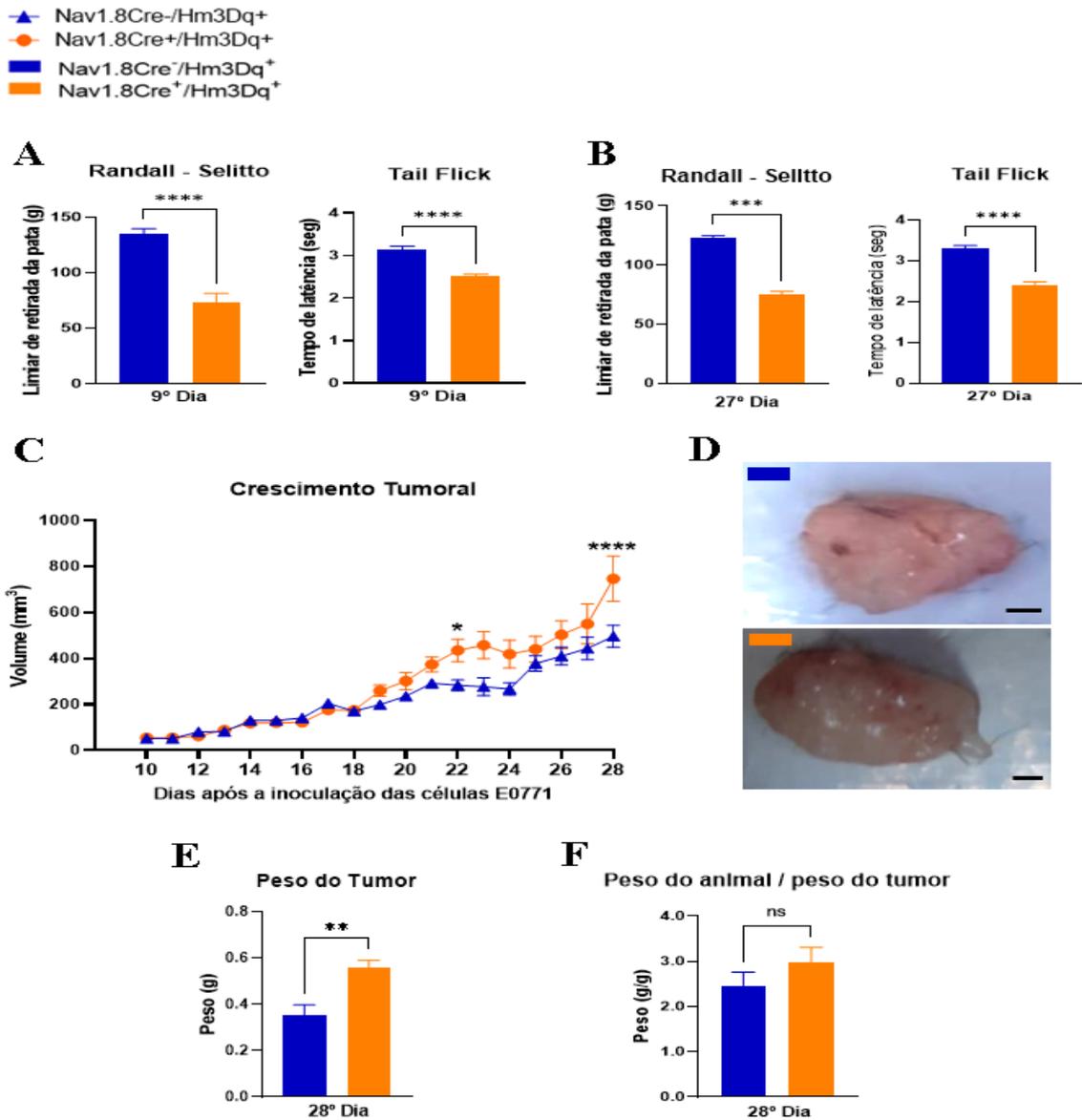


Figura 4. Testes nociceptivos e avaliação do tumor. Avaliação do tempo de resposta em segundos e no limiar nociceptivo em gramas ao insulto nocivo no grupo neuromodulado em relação ao grupo controle, testes *Randall-Selitto* e *Tail Flick*, no 9° e 27° dia do experimento, *Randall-Selitto* (9° dia $p < 0,0001$ / 27° dia: $p = 0,0006$), *Tail Flick* (9° dia: $p < 0,0001$ / 27° dia: $p < 0,0001$), (A e B). Curva de crescimento tumoral com aumento significativo do volume tumoral no grupo neuromodulado em relação ao grupo controle no 22° ($p = 0,0123$) e 28° dia ($p < 0,0001$), respectivamente C). Imagem representativa do tumor após eutanásia nos respectivos grupos. Barra de escala de 2mm (D). Avaliação do peso do tumor mamário no grupo neuromodulado em relação ao grupo controle após a eutanásia, ($p = 0,0050$) (E). Avaliação do percentual de peso corpóreo livre de peso tumoral não apresentou alterações significativas entre os respectivos grupos ($p = 0,2575$) (F). Foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, seguidos do teste *T* para dados paramétricos e do teste *Mann-Whitney* para dados não paramétricos. Para análises dos dados da curva de crescimento foi aplicado o teste *Bonferroni's multiple comparisons*. Foi considerado $p < 0,05$ como significativo para todas as análises e representados por média \pm erro da média.

6.3. Avaliação da função pulmonar dos animais modulados quimiogeneticamente

A mecânica ventilatória dos animais foi avaliada utilizando-se o espirômetro. A avaliação da resistência pulmonar (*RL*) dos camundongos neuromodulados Nav1.8^{cre⁺/hM3Dq⁺} foi menor (0.7694 ± 0.03944) em relação aos camundongos do grupo controle Nav1.8^{cre⁻/hM3Dq⁺} (1.024 ± 0.07712), sugerindo uma menor rigidez pulmonar nesse grupo (Fig. 5A).

A complacência estática (*C_{chord}*) e dinâmica (*C_{dyn}*), também foram avaliadas e refletem a capacidade elástica do pulmão em se distender durante a ventilação estática e durante a manobra ventilatória dinâmica. Os camundongos neuromodulados Nav1.8^{cre⁺/hM3Dq⁺} apresentaram uma maior complacência pulmonar estática e dinâmica (*C_{chord}*: 0.05733 ± 0.003129 / *C_{dyn}*: 0.02752 ± 0.002341) em relação aos camundongos do grupo controle Nav1.8^{cre⁻/hM3Dq⁺} (*C_{chord}*: 0.04594 ± 0.003489 / *C_{dyn}*: 0.01979 ± 0.001735), caracterizando uma melhor capacidade de distensão pulmonar desse grupo (Figs. 5B e C).

A capacidade vital forçada (*FVC*) representa o volume de ar total que o pulmão é capaz de inspirar e expirar (capacidade inspiratória, volume corrente e capacidade expiratória forçada), com exceção apenas do volume residual, em concordância com os dados anteriores de resistência e complacência, os camundongos neuromodulados Nav1.8^{cre⁺/hM3Dq⁺} apresentaram uma maior capacidade vital forçada (1.055 ± 0.04804) em relação aos camundongos controle Nav1.8^{cre⁻/hM3Dq⁺} (0.8504 ± 0.05540), caracterizando uma melhora do fluxo respiratório desse grupo (Fig. 5D). O pulmão dos camundongos neuromodulados Nav1.8^{cre⁺/hM3Dq⁺} apresentou maior capacidade inspiratória (IC) e maiores índices de volume expiratório forçado em 20 (FEV^{20ms}) e 50 (FEV^{50ms}) milissegundos (IC: 0.9086 ± 0.03899 / FEV^{20ms}: 0.6484 ± 0.009376 / FEV^{50ms}: 0.9847 ± 0.03934) em relação aos camundongos controle Nav1.8^{cre⁻/hM3Dq⁺} (IC: 0.7295 ± 0.04649 / FEV^{20ms}: 0.5184 ± 0.06002 / FEV^{50ms}: 0.7888 ± 0.05228) do grupo controle (Fig. 5E, F e G). Todos esses parâmetros caracterizam que a ventilação mecânica pulmonar nos animais neuromodulados foi menos afetada em relação ao grupo controle, sugerindo um menor acometimento metastático pulmonar do câncer de mama no grupo neuromodulado.

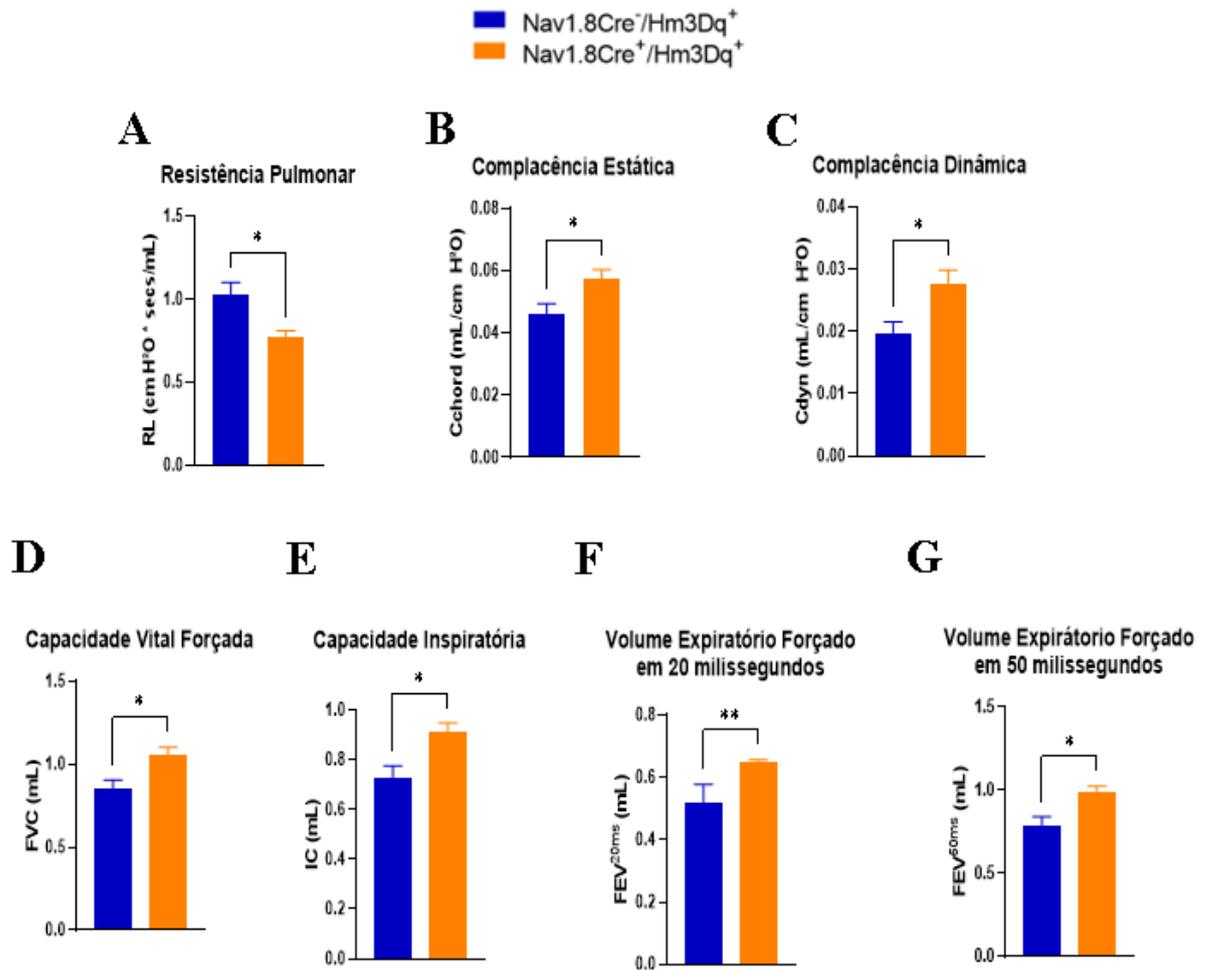


Figura 5. Avaliação da função pulmonar. Os animais Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (controle) e Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ (neuromodulado) foram submetidos a testes da função pulmonar e representados em gráficos de barras como se segue: Resistência pulmonar (**A**), Complacência Estática (**B**), Complacência Dinâmica (**C**), Capacidade Vital Forçada (**D**), Capacidade Inspiratória (**E**), Volume expiratório Forçado em 20 milissegundos (**F**) e Volume expiratório Forçado em 50 milissegundos (**G**). Azul grupo controle e laranja grupo neuromodulado. Uma menor rigidez e uma maior elasticidade pulmonar pode ser observada nos camundongos do grupo neuromodulados em relação ao grupo controle, através dos parâmetros mecânicos RL ($p=0,0126$), Cchord ($p=0,0378$) e Cdyn ($p=0,0309$), (**A**, **B** e **C**). Através da análise dos parâmetros de FVC ($p=0,0205$), IC ($p=0,0155$), FEV_{20ms} ($p=0,0087$) e FEV_{50ms} ($p=0,0137$), podemos notar que os camundongos neuromodulados inspiram e expiram um volume maior de ar em relação ao grupo controle (**D**, **E**, **F** e **G**). Foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, seguidos do teste *Mann-Whitney* para dados não paramétricos. Foi considerado $p < 0,05$ como significativo para todas as análises e representados por média \pm erro da média.

6.4. Avaliação do infiltrado inflamatório associado a metástase e quantificação de macrófagos no microambiente pulmonar

Análises histopatológicas pulmonares foram realizadas em lâminas de tecido pulmonar submetidas à coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E). Foi observado que todos os

camundongos de ambos os grupos apresentaram áreas de infiltrado inflamatório associadas a metástase pulmonar (Fig.6A). Análises qualitativas sugerem que os camundongos neuromodulados Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ apresentaram um acometimento em área e perímetro de infiltrado inflamatório associado a metástases menor em relação aos camundongos do grupo controle Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (Fig.6B), embora não tenha sido confirmado estatisticamente. Além disso, foi observado que os camundongos neuromodulados Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ tiveram uma quantidade de focos de infiltrado inflamatório associado a metástase menor (10.71 ± 1.973) em relação aos camundongos do grupo controle Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (20.00 ± 3.307), (Fig. 6C).

A fim de investigarmos o microambiente pulmonar e seus componentes sabidamente reconhecidos como potenciais agentes pró-tumorais, foi caracterizado a presença do marcador pan-macrófago F4/80⁺ por microscopia confocal no tecido pulmonar, bem como, no centro de regiões pulmonares com celularidade atípica do restante do tecido, sendo essas regiões sugestivas para áreas metastáticas (Fig. 6D). A quantificação de macrófagos F480 no tecido pulmonar demonstrou que os camundongos neuromodulados Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ apresentaram média de macrófagos por campo e número total de macrófagos por lâmina reduzidos (Média por campo: 14.97 ± 0.8957 / N° total por lâmina: 149.7 ± 8.957) em relação aos camundongos do grupo controle Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (Média por campo: 30.93 ± 4.359 / N° total por lâmina: 301.3 ± 46.77 , Fig.6E).

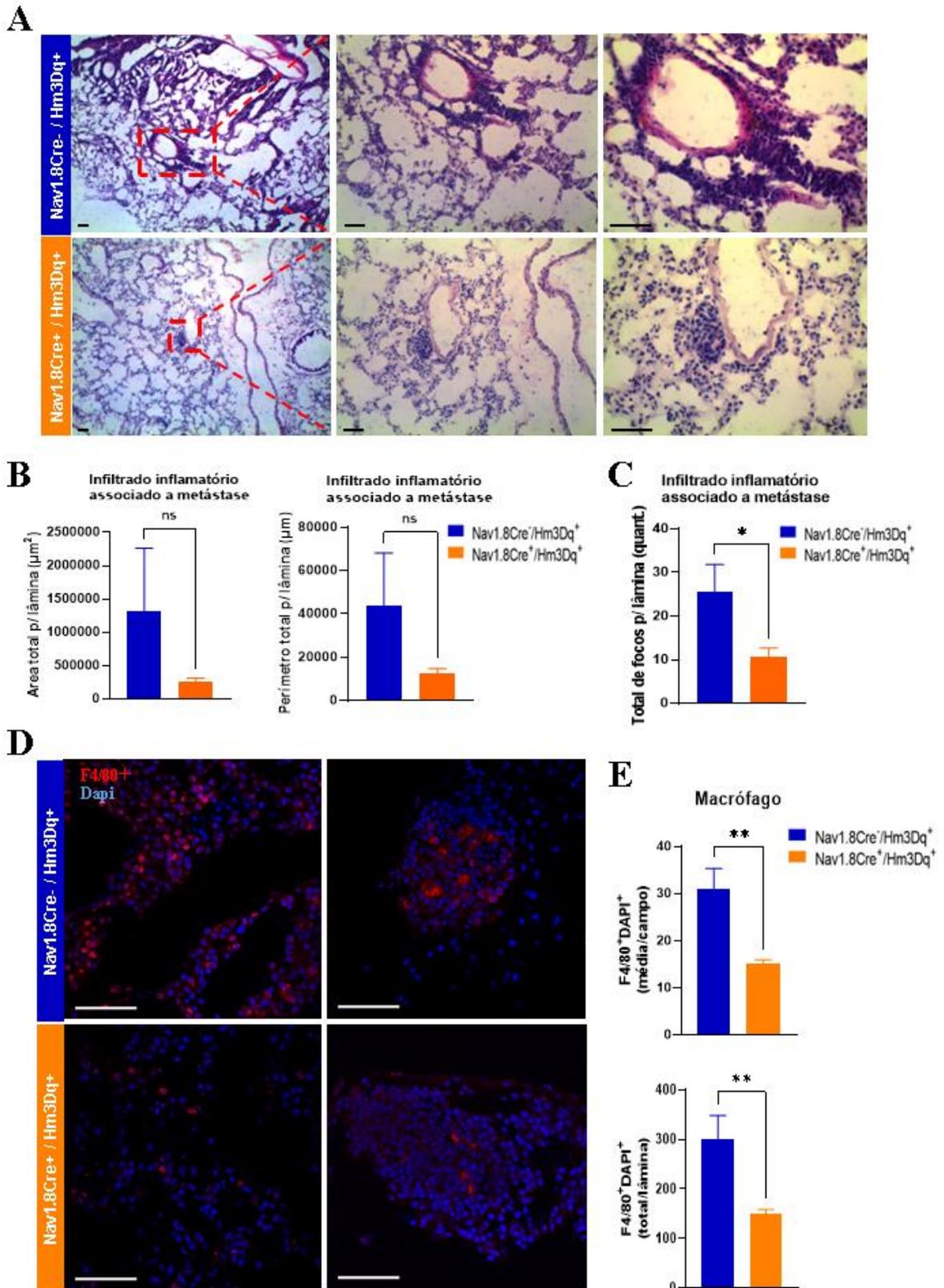


Figura 6. Infiltrado inflamatório associado a metástase e macrófagos. Imagens representativas de áreas de metástase pulmonar no grupo controle e neuromodulado, capturadas nas objetivas de 10x, 20x e 40x (A) respectivamente. Barra de escala de 100 μm . Área total em μm^2 e perímetro total (μm) de infiltrado inflamatório associado a metástase (área: $p=0,2765$ / perímetro: $p=0,2309$) (B). Focos totais de infiltrado inflamatório associado

a metástase no grupo neuromodulado apresentou-se reduzida ($p=0,0422$), (C). Imagens representativas da marcação difusa pan-macrófagos anti F4/80 no tecido pulmonar e no centro de regiões com celularidade atípica, sugestiva de aérea metastática. Imagens obtidas na objetiva de 40x utilizando microscópio de fluorescência confocal *Zeiss LSM 880*. Barra de escala de 50 μm (D). Redução do número de macrófagos no tecido pulmonar de camundongos neuromodulados em relação ao grupo controle, média de macrófagos ($p=0,0026$) contado por campo e número total de macrófagos ($p=0,0055$) contados por lâmina (E). Foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, seguidos do teste *Mann-Whitney* para dados não paramétricos. Foi considerado $p<0,05$ como significativo para todas as análises e representados por média \pm erro da média.

6.5. Avaliação do perfil linfóide inato (ILCs) no microambiente tumoral

Buscando avaliar se a modulação quimiogénica dos neurónios sensoriais pode impactar no perfil de resposta linfóide inata no microambiente tumoral, foi realizado a citometria de fluxo de um fragmento tumoral, com objetivo de avaliar a população de ILCs. A modulação quimiogénica de neurónios sensoriais *Nav1.8* não promoveu alterações significativas na frequência de ILCs total presentes no microambiente tumoral mamário (Fig. 7A). Entretanto, ao avaliar as subpopulações de ILCs foi observado que os camundongos neuromodulados *Nav1.8^{cre+}/hM3Dq⁺* apresentaram uma redução (0.02014 ± 0.002807) da frequência de população de ILC3 do tipo reguladoras (Reg) intratumoral em relação ao grupo controle *Nav1.8^{cre-}/hM3Dq⁺* (0.03357 ± 0.005214). As demais subpopulações de ILCs avaliadas (ILC1, ILC2 e ILC3) no câncer de mama não apresentaram alterações significativas entre os grupos (Fig. 7B).

Painel linfóide inato (tumoral)

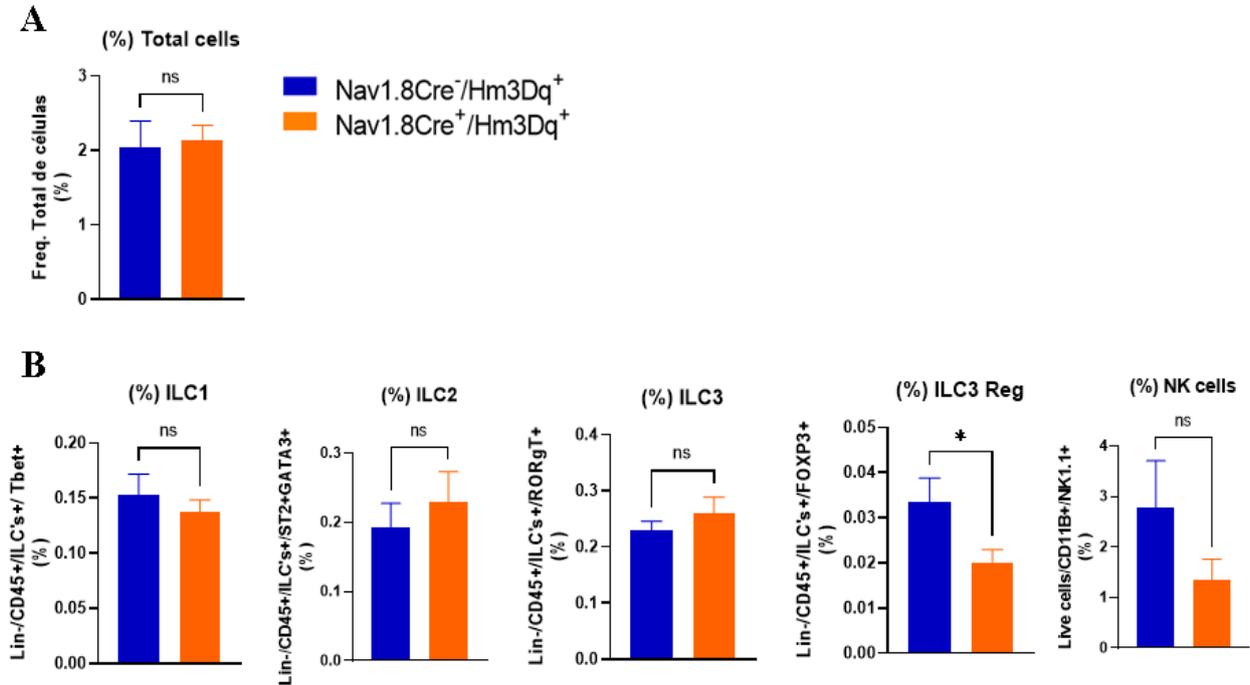


Figura 7. Citometria de células linfóides inatas (ILCs) intratumoral. Frequência (%) total de ILCs no microambiente tumoral ($p=0,6200$), (A). Frequência (%) de subpopulações, ILC1 ($p=0,4912$), ILC2 ($p=0,5172$), ILC3 ($p=0,3693$), ILC3 Reguladora ($p=0,0426$) e Células NK ($p=0,1649$), (B). Foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, seguidos do teste *Mann-Whitney* para dados não paramétricos. Foi considerado $p<0,05$ como significativo para todas as análises e representados por média \pm erro da média.

6.6. Avaliação do perfil linfóide adaptativo no microambiente tumoral

A fim de avaliar o reflexo da modulação quimiogénica dos neurónios sensoriais no perfil de resposta linfóide adaptativa no microambiente tumoral, realizamos citometria de fluxo para caracterizar as populações TCD4 e TCD8 e suas subpopulações no microambiente tumoral. Através dessa análise, foi observado que a modulação dos neurónios sensoriais nos camundongos Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ reduziu a frequência da subpopulação Treg⁺CD4⁺ intratumoral (0.004550 ± 0.0005294) em relação ao grupo controle Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (0.01228 ± 0.003466), (Fig.8A). A neuromodulação de camundongos Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ também promoveu uma redução na frequência de células TCD8 totais intratumoral (9.957 ± 0.6162) em relação ao controle Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (14.32 ± 1.329), bem como, reduziu a frequência da subpopulação Tc2⁺CD8⁺ (9.153 ± 0.5338) intratumorais em relação aos

camundongos controle Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (12.97±1.366), (Fig.8B). Entretanto, a neuromodulação de camundongos Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ aumentou a frequência de população Tc1⁺CD8⁺ (11.94±1.458) em relação aos camundongos controle Nav1.8cre⁻/hM3Dq⁺ (8.057±0.5205),concluindo que a atividade estimulada de neurônios sensoriais Nav1.8 é capaz de modular a imunidade adaptativa.

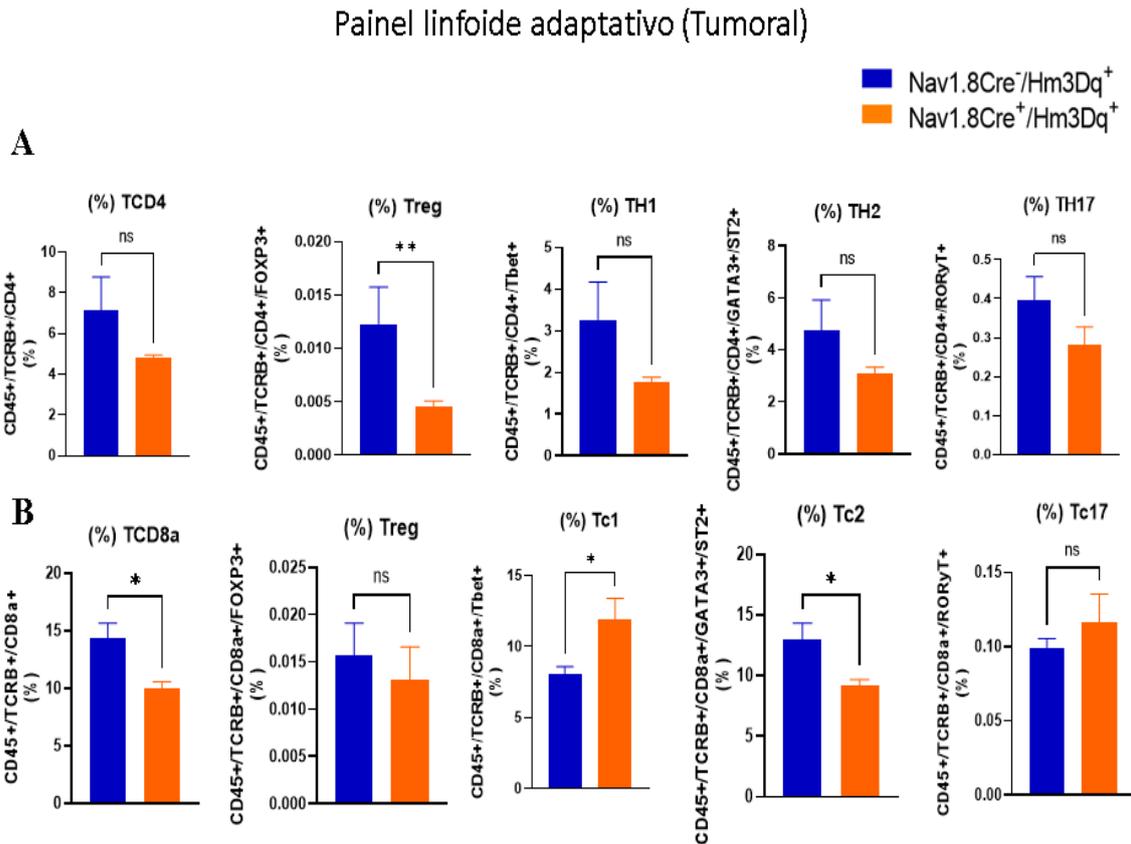


Figura 8. Citometria de células de perfil linfóide adaptativo no microambiente tumoral. Frequência da população total de TCD4 (p=0,7308), Treg⁺CD4⁺ (p=0,0022), Th1⁺CD4⁺ (p=0,1807), Th2⁺CD4⁺ (p=0,6282) e Th17⁺CD4⁺ (p=0,1905), (A). Frequência de TCD8a (p=0,0350), Treg⁺CD8⁺ (p=0,5554) Th1⁺CD8⁺ (p=0,0350), Th2⁺CD8⁺ (p=0,0332) e Th17⁺CD8⁺ (p=0,9798) (B). Foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, seguidos do teste *Mann-Whitney* para dados não paramétricos. Foi considerado p<0,05 como significativo para todas as análises e representados por média ± erro da média.

6.7. Avaliação do perfil de células mielóides intratumoral

Foi realizado análise de painel mielóide, a fim de investigar os possíveis impactos que a atividade dos neurônios sensoriais Nav1.8 poderia exercer sobre a população imune de perfil mielóide. Entretanto, a modulação quimiogenética dos camundongos Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ não

promoveu alterações significativas na frequência de células CD11B totais (Fig.9A), assim como nas demais células de perfil mielóide no microambiente tumoral da mama (Fig.9B).

Painel mielóide(Tumoral)

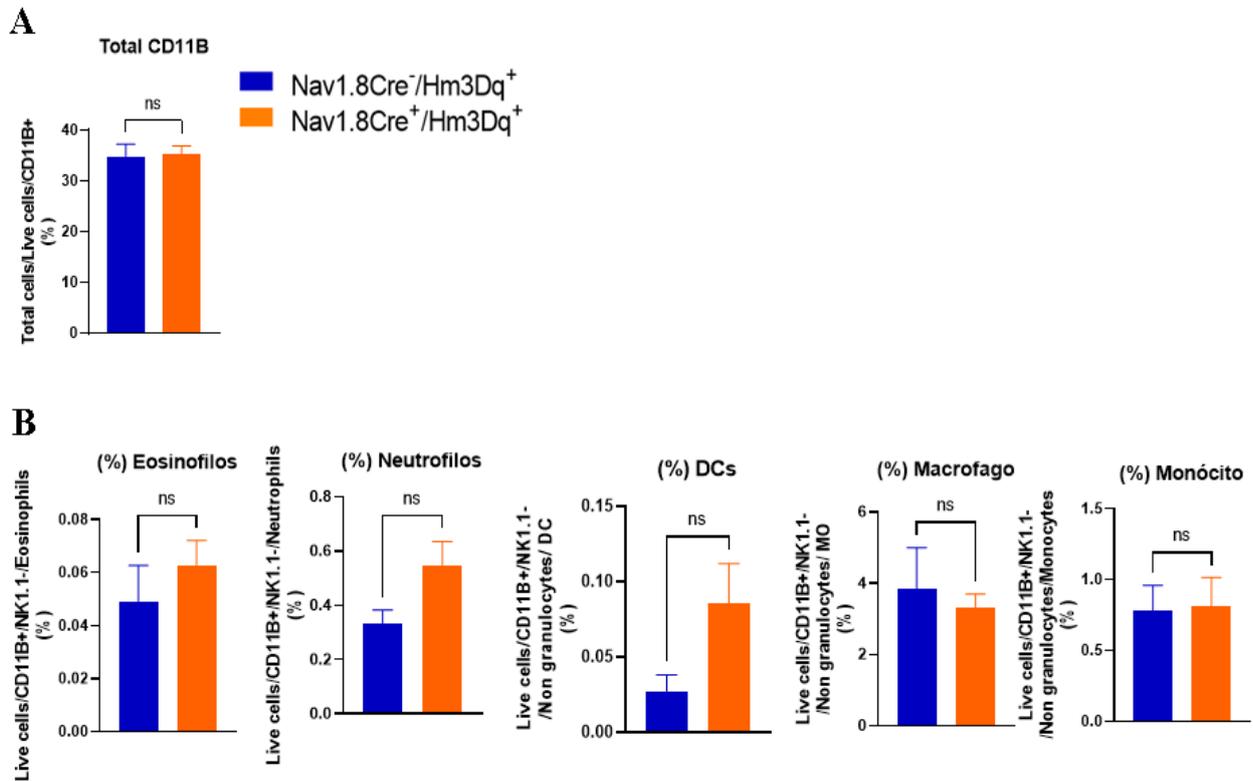


Figura 9. Citometria de células mielóides intratumoral. Frequência de CD11B ($p=0,9015$), (A). Frequência de Eosinófilos ($p=0,3316$), Neutrófilos ($p=0,0769$), Células Dendríticas ($p=0,0584$), Macrófagos ($p=0,5338$) e Monócitos ($p=0,9295$), (B). Foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, seguidos do teste *Mann-Whitney* para dados não paramétricos. Foi considerado $p<0,05$ como significativo para todas as análises e representados por média \pm erro da média.

7. DISCUSSÃO

A complexa fisiologia pulmonar envolvendo trocas gasosas, reflexos de tosse e regulação da distensão ou contração das vias aéreas é mediada por interações entre o sistema nervoso central e periférico (BARNES, 1984). A inervação sensorial está presente no tecido pulmonar desempenhando papel importante na sinalização de estímulos lesivos e no controle da distensão das vias aéreas durante a respiração (SU; BARR; JAQUISH; XU *et al.*, 2022).

Sabe-se que as terminações sensoriais predominantemente vagais que inervam o pulmão, sejam compostas de nociceptores TRPV1⁺, vagais Calb1⁺ e peptidérgicos Tac1⁺ (SU; BARR; JAQUISH; XU *et al.*, 2022), Aqui conseguimos caracterizar fenotipicamente a presença

de terminações sensoriais do canal de sódio dependente de voltagem 1.8 (Nav1.8) utilizando animais transgênicos com fluorescência endógena. Esse achado corrobora com outro estudo recente que relatou a expressão gênica de muitos subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav1), incluindo Nav1.8, nos gânglios jugulares que inervam o sistema respiratório (KOLLARIK; SUN; HERBSTSOMER; RU *et al.*, 2018).

A presença dos neurônios sensoriais vem sendo descrita em diversos tumores, mas seu perfil de atuação parece ser contraditório entre diferentes modelos tumorais. A inibição da atividade neuronal sensorial, bem como, a desnervação química reduzem o desenvolvimento de alguns tumores sólidos, como o carcinoma basocelular (PETERSON; EBERL; VAGNOZZI; BELKADI *et al.*, 2015), câncer de próstata (MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013) e câncer gástrico (POLLI-LOPES; ZUCOLOTO; DE QUEIROS CUNHA; DA SILVA FIGUEIREDO *et al.*, 2003; ZHAO; HAYAKAWA; KODAMA; MUTHUPALANI *et al.*, 2014). Entretanto, a inibição da atividade neuronal sensorial, assim como, a depleção e vagotomia de neurônios sensoriais acelerou o crescimento e a progressão no melanoma cutâneo (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021; PRAZERES; LEONEL; SILVA; ROCHA *et al.*, 2020), no câncer pancreático (SALOMAN; ALBERS; LI; HARTMAN *et al.*, 2016) e no câncer de mama (ERIN, 2020).

Neste estudo, observamos que a estimulação dos neurônios sensoriais Nav1.8, através da modulação quimiogênica promoveu o aumento do volume tumoral no 22º e 28º dia experimental, o que contrastou com o resultado da estimulação dos neurônios sensoriais TRPV1⁺ com a capsaicina no tumor primário de mama (ERIN, 2020). É importante destacar que a metodologia de estimulação sensorial e o subtipo de terminação sensorial foram diferentes. Dito isso, nós hipotetizamos que a estimulação de neurônios sensoriais através da modulação quimiogênica, embora aumente o volume do tumor primário, reduza a sua capacidade de metastatizar para o pulmão. Já quando buscamos avaliar o efeito da modulação de neurônios Nav1.8 na metástase pulmonar, observamos uma melhora da função pulmonar, redução de infiltrado inflamatório associado a metástase no pulmão e redução das populações de macrófagos, achados congruentes com o de Erin e *cols.* (ERIN, 2020).

Outro estudo relatou que embora não tenha sido observadas alterações significativas no crescimento do tumor primário da mama, camundongos inoculados com células neoplásicas mamárias em conjunto com gânglios da raiz dorsal (DRGs), apresentaram um aumento de metástase pulmonar em comparação a animais inoculados apenas com as células neoplásicas mamárias (LE; PAYNE; BUCKWALD; HAYES *et al.*, 2022), o que diverge dos nossos

achados. Entretanto, a inibição ou estimulação dos neurônios sensoriais que compõe o DRG nesse experimento não foi avaliada, desfavorecendo uma discussão comparativa com os resultados obtidos em nosso estudo.

A presença de neurônios sensoriais no pulmão, vai além da sua função de captar estímulos ou controlar a distensão pulmonar. As terminações Trpv1⁺ interagem com os vasos linfáticos contribuindo para a drenagem de fluidos e regulando as respostas imunes no pulmão, participando da supressão de células T gama-delta residentes e do recrutamento de neutrófilos durante a infecção bacteriana (BARAL; UMANS; LI; WALLRAPP et al., 2018). Neste estudo, objetivamos avaliar se a modulação dos neurônios sensoriais regularia a populações de macrófagos. Caracterizamos que os animais neuromodulados tiveram uma redução significativa na população de macrófagos pulmonares. Vale mencionar que o maior número de macrófagos é frequentemente associado a um pior prognóstico, promovendo a progressão tumoral e uma maior carga metastática no pulmão (CONDEELIS; POLLARD, 2006; LIN; NGUYEN; RUSSELL; POLLARD, 2001; NOY; POLLARD, 2014). Evidenciando o papel protetor da neuromodulação nos animais Nav1.8^{cre⁺/hM3Dq⁺}.

Além disso, esse resultado por sua vez é congruente com a redução nos focos de infiltrado inflamatório associado a metástase observados, refletindo em uma melhora da resposta ventilatória mecânica nesse grupo. Essa melhor resposta da ventilação pulmonar observada está associada a um menor acometimento metastático e maior preservação do tecido pulmonar, possivelmente em decorrência dos efeitos da estimulação dos neurônios sensoriais, como observado em estudos anteriores (ERIN, 2020; KAMIYA; HAYAMA; KATO; SHIMOMURA *et al.*, 2019).

Nesse trabalho, através da modulação quimiogênica sistêmica de neurônios sensoriais nociceptivos Nav 1.8, observamos que embora o tumor primário tenha aumentado, a melhora da mecânica pulmonar, bem como, a redução da população de macrófagos no tecido pulmonar, sugerem que quando estimulados, os neurônios sensoriais regulam um microambiente pulmonar menos favorável à instalação e propagação da metástase espontânea do câncer de mama.

Os neurônios podem atuar ativamente orquestrando e regulando respostas imunes anti-tumorais através de neurotransmissores (BARRON; CONNOLLY; SHARP; BENNETT *et al.*, 2011; MELHEM-BERTRANDT; CHAVEZ-MACGREGOR; LEI; BROWN *et al.*, 2011). Um dos principais neuropeptídeos secretados no câncer de mama é a Substância P, que regula a resposta imune (ERIN, 2020).

As interações entre o sistema nervoso e o sistema imunológico participam na manutenção da homeostase. Mudanças nesses mecanismos podem estar ligadas ao desenvolvimento e disseminação do câncer (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021). O aumento da população inata de função similar a células Treg, aqui chamadas de ILC3 Reg assim como a sua contraparte adaptativa é um mal prognóstico no câncer de mama (GAMAGE; SHAHOEI; ALBRIGHT; WANG *et al.*, 2023; HUANG; ZHOU; ZHENG; YU *et al.*, 2023), tendo em vista sua atividade imunossupressora no microambiente tumoral, resultando na progressão tumoral e consequente metástase. Aqui observamos que modulação da atividade de neurônios sensoriais reduz significativamente a frequência da população de ILC3Reg (ILC⁺FoxP3⁺) e Treg (CD4⁺FoxP3⁺) intratumoral desfavorecendo a ação imunossupressora das células neoplásicas, que é fundamental para o escape das células tumorais e sua metastatização (HUANG; ZHOU; ZHENG; YU *et al.*, 2023). Além disso, o fenótipo Tc2 (CD8⁺GATA3⁺) das células TCD8 infiltrantes tumoral promove um aumento na produção de IL-4 e consequente redução de IFN- γ no microambiente tumoral, facilitando o escape imunológico das células neoplásicas, o que foi correlacionado com a exaustão e redução de células TCD8 de perfil citotóxicas Tc1 (CD8⁺Tbet⁺) no câncer de bexiga urotelial e câncer cervical (HARTANA; AHLEN BERGMAN; ZIRAKZADEH; KRANTZ *et al.*, 2018; KOH; LEE; KWAK; KIM *et al.*, 2023; SHEU; LIN; LIEN; HO *et al.*, 2001). Aqui caracterizamos que a neuromodulação dos neurônios sensoriais Nav1.8 reduziu a frequência do perfil Tc2 (CD8⁺GATA3⁺) no microambiente tumoral da mama, além de promover aumento da frequência de células com perfil citotóxico Tc1 criando um microambiente tumoral mais citotóxico e menos favorável a progressão e metástase no câncer de mama (FLUXA; ROJAS-SEPULVEDA; GLEISNER; TITTARELLI *et al.*, 2018; KOH; LEE; KWAK; KIM *et al.*, 2023; SUN; ZHAI; CHEN; DONG *et al.*, 2019)

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível confirmar a presença de neurônios sensoriais Nav1.8 no microambiente pulmonar por microscopia de fluorescência, o que sugere um potencial papel dessas fibras na regulação local do tecido. Além de comprovarmos a efetiva modulação desses neurônios sensoriais de forma sistêmica, durante todo o experimento, já que os testes nociceptivos evidenciaram que os camundongos neuromodulados Nav1.8cre⁺/hM3Dq⁺ apresentam uma resposta comportamental mais rápida aos estímulos sensoriais no início e no fim do experimento.

Ao final do experimento, observou-se um aumento do volume tumoral nos animais neuromodulados em comparação com os controles. Entretanto, as análises histopatológicas mostraram uma redução significativa no número de focos de infiltrado inflamatório associado à metástase nos camundongos neuromodulados. Além disso, o grupo neuromodulado apresentou menor frequência de ILC3 Reg, menor frequência de células Treg⁺CD4⁺ e menor frequência de células Tc2⁺CD8⁺ no microambiente tumoral e a redução na contagem de macrófagos do tecido pulmonar, fatores que são favoráveis a metástase. Portanto, indicam um efeito imunoprotetor da inervação sensorial, desenvolvido pela modulação dos neurônios sensoriais Nav1.8, além de uma capacidade de potencializar o aumento de células efetoras de perfil citotóxico Tc1⁺CD8⁺ no microambiente tumoral. Esses resultados são congruentes com a análises da mecânica pulmonar, que revelou que os camundongos neuromodulados possuem uma menor rigidez pulmonar. Além de apresentar uma melhora significativa nos parâmetros de capacidade vital forçada, indicando uma melhor capacidade respiratória e preservação da função pulmonar em comparação com os controles.

Em conjunto, esses achados indicam que a modulação da atividade dos neurônios sensoriais Nav1.8 embora promova ao aumento do volume tumoral, pode promover uma regulação positiva da imunidade antitumoral além de criar um microambiente pulmonar desfavorável para a metastatização do câncer de mama. Oferecendo uma nova proposta, através da utilização da tecnologia DREADD para investigar atividade desses neurônios na metástase espontânea pulmonar no modelo de câncer mamário E0771. No entanto, são necessários estudos adicionais para elucidar os mecanismos subjacentes a esses efeitos e determinar o potencial terapêutico da neuromodulação quimiogénica na prevenção e tratamento da metástase pulmonar do câncer de mama.

9. REFERÊNCIAS

ANSELONI, V. C.; ENNIS, M.; LIDOW, M. S. Optimization of the mechanical nociceptive threshold testing with the Randall-Selitto assay. **J Neurosci Methods**, 131, n. 1-2, p. 93-97, Dec 30 2003.

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.

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

BARNES, P. J. The third nervous system in the lung: physiology and clinical perspectives. **Thorax**, 39, n. 8, p. 561-567, Aug 1984.

BARRON, T. I.; CONNOLLY, R. M.; SHARP, L.; BENNETT, K. *et al.* Beta blockers and breast cancer mortality: a population- based study. **J Clin Oncol**, 29, n. 19, p. 2635-2644, Jul 1 2011.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J Pathol**, 196, n. 3, p. 254-265, Mar 2002.

BOILLY, B.; FAULKNER, S.; JOBLING, P.; HONDERMARCK, H. Nerve Dependence: From Regeneration to Cancer. **Cancer Cell**, 31, n. 3, p. 342-354, Mar 13 2017.

BONAPACE, L.; COISSIEUX, M. M.; WYCKOFF, J.; MERTZ, K. D. *et al.* Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. **Nature**, 515, n. 7525, p. 130-133, Nov 6 2014.

BURNS, A. R.; SMITH, C. W.; WALKER, D. C. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. **Physiol Rev**, 83, n. 2, p. 309-336, Apr 2003.

CAI, R.; TRESSLER, C. M.; CHENG, M.; SONKAR, K. *et al.* Primary breast tumor induced extracellular matrix remodeling in premetastatic lungs. **Sci Rep**, 13, n. 1, p. 18566, Oct 30 2023.

CAMPA, C. C.; SILVA, R. L.; MARGARIA, J. P.; PIRALI, T. *et al.* Inhalation of the prodrug PI3K inhibitor CL27c improves lung function in asthma and fibrosis. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 5232, Dec 12 2018.

CASTILLO-GONZALEZ, R.; VALLE-NOGUERA, A.; GOMEZ-SANCHEZ, M. J.; XIA, P. *et al.* Innate lymphoid cells type 3 in cancer. **Front Immunol**, 13, p. 1033252, 2022.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, 331, n. 6024, p. 1559-1564, Mar 25 2011.

CHEN, J. J.; LIN, Y. C.; YAO, P. L.; YUAN, A. *et al.* Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. **J Clin Oncol**, 23, n. 5, p. 953-964, Feb 10 2005.

COLEGIO, O. R.; CHU, N. Q.; SZABO, A. L.; CHU, T. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, 513, n. 7519, p. 559-563, Sep 25 2014.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, 124, n. 2, p. 263-266, Jan 27 2006.

CONSTANTINIDES, M. G.; MCDONALD, B. D.; VERHOEF, P. A.; BENDELAC, A. A committed precursor to innate lymphoid cells. **Nature**, 508, n. 7496, p. 397-401, Apr 17 2014.

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.

ERIN, N. Role of sensory neurons, neuroimmune pathways, and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in a murine model of breast cancer metastasis. **Cancer Immunol Immunother**, 69, n. 2, p. 307-314, Feb 2020.

FAULKNER, S.; JOBLING, P.; MARCH, B.; JIANG, C. C. *et al.* Tumor Neurobiology and the War of Nerves in Cancer. **Cancer Discov**, 9, n. 6, p. 702-710, Jun 2019.

FLUXA, P.; ROJAS-SEPULVEDA, D.; GLEISNER, M. A.; TITTARELLI, A. *et al.* High CD8(+) and absence of Foxp3(+) T lymphocytes infiltration in gallbladder tumors correlate with prolonged patients survival. **BMC Cancer**, 18, n. 1, p. 243, Mar 2 2018.

FUCHS, A.; COLONNA, M. Innate lymphoid cells in homeostasis, infection, chronic inflammation and tumors of the gastrointestinal tract. **Curr Opin Gastroenterol**, 29, n. 6, p. 581-587, Nov 2013.

GAMAGE, H. E. V.; SHAHOEI, S. H.; ALBRIGHT, S. T.; WANG, Y. *et al.* Re-education of myeloid immune cells to reduce regulatory T cell expansion and impede breast cancer progression. **bioRxiv**, Aug 14 2023.

GAO, D.; DU, J.; CONG, L.; LIU, Q. Risk factors for initial lung metastasis from breast invasive ductal carcinoma in stages I-III of operable patients. **Jpn J Clin Oncol**, 39, n. 2, p. 97-104, Feb 2009.

GARNER, H.; DE VISSER, K. E. Immune crosstalk in cancer progression and metastatic spread: a complex conversation. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 8, p. 483-497, Aug 2020.

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.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, 5, n. 12, p. 953-964, Dec 2005.

HAO, S. J.; WAN, Y.; XIA, Y. Q.; ZOU, X. *et al.* Size-based separation methods of circulating tumor cells. **Adv Drug Deliv Rev**, 125, p. 3-20, Feb 1 2018.

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.

HARTANA, C. A.; AHLEN BERGMAN, E.; ZIRAKZADEH, A. A.; KRANTZ, D. *et al.* Urothelial bladder cancer may suppress perforin expression in CD8⁺ T cells by an ICAM-1/TGFbeta2 mediated pathway. **PLoS One**, 13, n. 7, p. e0200079, 2018.

HONDERMARCK, H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, 23, n. 6, p. 357-365, Dec 2012.

HUANG, P.; ZHOU, X.; ZHENG, M.; YU, Y. *et al.* Regulatory T cells are associated with the tumor immune microenvironment and immunotherapy response in triple-negative breast cancer. **Front Immunol**, 14, p. 1263537, 2023.

INSUELA, D. B.; DALEPRANE, J. B.; COELHO, L. P.; SILVA, A. R. *et al.* Glucagon induces airway smooth muscle relaxation by nitric oxide and prostaglandin E(2). **J Endocrinol**, 225, n. 3, p. 205-217, Jun 2015.

IRSHAD, S.; FLORES-BORJA, F.; LAWLER, K.; MONYPENNY, J. *et al.* RORgammat(+) Innate Lymphoid Cells Promote Lymph Node Metastasis of Breast Cancers. **Cancer Res**, 77, n. 5, p. 1083-1096, Mar 1 2017.

ITO, A.; AKAMA, Y.; SATOH-TAKAYAMA, N.; SAITO, K. *et al.* Possible Metastatic Stage-Dependent ILC2 Activation Induces Differential Functions of MDSCs through IL-13/IL-13Ralpha1 Signaling during the Progression of Breast Cancer Lung Metastasis. **Cancers (Basel)**, 14, n. 13, Jul 4 2022.

JIN, L.; HAN, B.; SIEGEL, E.; CUI, Y. *et al.* Breast cancer lung metastasis: Molecular biology and therapeutic implications. **Cancer Biol Ther**, 19, n. 10, p. 858-868, 2018.

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. **Nat Neurosci**, 22, n. 8, p. 1289-1305, Aug 2019.

KOH, C. H.; LEE, S.; KWAK, M.; KIM, B. S. *et al.* CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential. **Exp Mol Med**, 55, n. 11, p. 2287-2299, Nov 2023.

KOLLARIK, M.; SUN, H.; HERBSTSOMER, R. A.; RU, F. *et al.* Different role of TTX-sensitive voltage-gated sodium channel (Na(V) 1) subtypes in action potential initiation and conduction in vagal airway nociceptors. **J Physiol**, 596, n. 8, p. 1419-1432, Apr 15 2018.

LE, T. T.; PAYNE, S. L.; BUCKWALD, M. N.; HAYES, L. A. *et al.* Sensory nerves enhance triple-negative breast cancer invasion and metastasis via the axon guidance molecule PlexinB3. **NPJ Breast Cancer**, 8, n. 1, p. 116, Nov 4 2022.

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

LI, R. Q.; ZHAO, X. H.; ZHU, Q.; LIU, T. *et al.* Exploring neurotransmitters and their receptors for breast cancer prevention and treatment. **Theranostics**, 13, n. 3, p. 1109-1129, 2023.

LIN, E. Y.; NGUYEN, A. V.; RUSSELL, R. G.; POLLARD, J. W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. **J Exp Med**, 193, n. 6, p. 727-740, Mar 19 2001.

LUO, Z.; YANG, F.; LIU, K.; DING, Z. ZC3H12A inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer under hypoxic condition via the inactivation of IL-17 signaling pathway. **Cell Cycle**, p. 1-17, Feb 15 2024.

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.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol**, 22, n. 2, p. 231-237, Apr 2010.

MEI, M.; TANG, L.; ZHOU, H.; XUE, N. *et al.* Honokiol prevents lung metastasis of triple-negative breast cancer by regulating polarization and recruitment of macrophages. **Eur J Pharmacol**, 959, p. 176076, Nov 15 2023.

MELHEM-BERTRANDT, A.; CHAVEZ-MACGREGOR, M.; LEI, X.; BROWN, E. N. *et al.* Beta-blocker use is associated with improved relapse-free survival in patients with triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol**, 29, n. 19, p. 2645-2652, Jul 1 2011.

MONTALDO, E.; VACCA, P.; MORETTA, L.; MINGARI, M. C. Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. **Semin Immunol**, 26, n. 2, p. 107-113, Apr 2014.

NARAYAN, P.; FLYNN, J.; ZHANG, Z.; GILLESPIE, E. F. *et al.* Perineural invasion as a risk factor for locoregional recurrence of invasive breast cancer. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 12781, Jun 17 2021.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**, 41, n. 1, p. 49-61, Jul 17 2014.

OSTRAND-ROSENBERG, S.; FENSELAU, C. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment. **J Immunol**, 200, n. 2, p. 422-431, Jan 15 2018.

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.

PETERSON, S. C.; EBERL, M.; VAGNOZZI, A. N.; BELKADI, A. *et al.* Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. **Cell Stem Cell**, 16, n. 4, p. 400-412, Apr 2 2015.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nat Rev Immunol**, 9, n. 4, p. 259-270, Apr 2009.

POLLI-LOPES, A. C.; ZUCOLOTO, S.; DE QUEIROS CUNHA, F.; DA SILVA FIGUEIREDO, L. A. *et al.* Myenteric denervation reduces the incidence of gastric tumors in rats. **Cancer Lett**, 190, n. 1, p. 45-50, Feb 10 2003.

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.

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.

REAVIS, H. D.; CHEN, H. I.; DRAPKIN, R. Tumor Innervation: Cancer Has Some Nerve. **Trends Cancer**, 6, n. 12, p. 1059-1067, Dec 2020.

RESTAINO, A. C.; VERMEER, P. D. Neural regulations of the tumor microenvironment. **FASEB Bioadv**, 4, n. 1, p. 29-42, Jan 2022.

RUSSO, R. C.; SAVINO, B.; MIROLO, M.; BURACCHI, C. *et al.* The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2(+) and CCR5(+) IFN γ -producing gammadeltaT cells in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 314, n. 6, p. L1010-L1025, Jun 1 2018.

RYDER, M.; GHOSSEIN, R. A.; RICARTE-FILHO, J. C.; KNAUF, J. A. *et al.* Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, 15, n. 4, p. 1069-1074, Dec 2008.

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. [Breast cancer epidemiology]. **Presse Med**, 48, n. 10, p. 1076-1084, Oct 2019.

SEYFRIED, T. N.; HUYSENTRUYT, L. C. On the origin of cancer metastasis. **Crit Rev Oncog**, 18, n. 1-2, p. 43-73, 2013.

SHAASHUA, L.; SHABAT-SIMON, M.; HALDAR, R.; MATZNER, P. *et al.* Perioperative COX-2 and beta-Adrenergic Blockade Improves Metastatic Biomarkers in Breast Cancer Patients in a Phase-II Randomized Trial. **Clin Cancer Res**, 23, n. 16, p. 4651-4661, Aug 15 2017.

SHARMA, R.; SHARMA, R.; KHAKET, T. P.; DUTTA, C. *et al.* Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. **Cell Oncol (Dordr)**, 40, n. 3, p. 199-208, Jun 2017.

SHEU, B. C.; LIN, R. H.; LIEN, H. C.; HO, H. N. *et al.* Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. **J Immunol**, 167, n. 5, p. 2972-2978, Sep 1 2001.

SMID, M.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; SIEUWERTS, A. M. *et al.* Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. **Cancer Res**, 68, n. 9, p. 3108-3114, May 1 2008.

SPITS, H.; ARTIS, D.; COLONNA, M.; DIEFENBACH, A. *et al.* Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. **Nat Rev Immunol**, 13, n. 2, p. 145-149, Feb 2013.

SU, Y.; BARR, J.; JAQUISH, A.; XU, J. *et al.* Identification of lung innervating sensory neurons and their target specificity. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 322, n. 1, p. L50-L63, Jan 1 2022.

SUN, Y.; ZHAI, C.; CHEN, X.; DONG, Z. *et al.* Characterization of PD-L1 protein expression and CD8(+) tumor-infiltrating lymphocyte density, and their associations with clinical outcome in small-cell lung cancer. **Transl Lung Cancer Res**, 8, n. 6, p. 748-759, Dec 2019.

TIAN, Z.; VAN VELKINBURGH, J. C.; WU, Y.; NI, B. Innate lymphoid cells involve in tumorigenesis. **Int J Cancer**, 138, n. 1, p. 22-29, Jan 1 2016.

UROOJ, T.; WASIM, B.; MUSHTAQ, S.; SHAH, S. N. N. *et al.* Cancer Cell-derived Secretory Factors in Breast Cancer-associated Lung Metastasis: Their Mechanism and Future Prospects. **Curr Cancer Drug Targets**, 20, n. 3, p. 168-186, 2020.

VANOIRBEEK, J. A.; RINALDI, M.; DE VOOGHT, V.; HAENEN, S. *et al.* Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 42, n. 1, p. 96-104, Jan 2010.

VLADIMIROVNA, I. L.; SOSUNOVA, E.; NIKOLAEV, A.; NENASHEVA, T. Mesenchymal Stem Cells and Myeloid Derived Suppressor Cells: Common Traits in Immune Regulation. **J Immunol Res**, 2016, p. 7121580, 2016.

VOIGT, C.; MAY, P.; GOTTSCHLICH, A.; MARKOTA, A. *et al.* Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4(+) T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, n. 49, p. 12994-12999, Dec 5 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.

WEST, J. B. The original presentation of Boyle's law. **J Appl Physiol (1985)**, 87, n. 4, p. 1543-1545, Oct 1999.

ZHANG, W. J.; WANG, X. H.; GAO, S. T.; CHEN, C. *et al.* Tumor-associated macrophages correlate with phenomenon of epithelial-mesenchymal transition and contribute to poor prognosis in triple-negative breast cancer patients. **J Surg Res**, 222, p. 93-101, Feb 2018.

ZHANG, Y.; LIU, C.; GAO, J.; SHAO, S. *et al.* IL-22 promotes tumor growth of breast cancer cells in mice. **Ageing (Albany NY)**, 12, n. 13, p. 13354-13364, Jul 10 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, N.; ZHU, W.; WANG, J.; LIU, W. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote TNBC lung metastasis via the IL-13-MDSC axis in a murine tumor model. **Int Immunopharmacol**, 99, p. 107924, Oct 2021.

ZHU, X. D.; ZHANG, J. B.; ZHUANG, P. Y.; ZHU, H. G. *et al.* High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. **J Clin Oncol**, 26, n. 16, p. 2707-2716, Jun 1 2008.