

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

MARISA SALVI

**PAPEL DAS FIBRAS NERVOSAS SENSORIAIS NA PROGRESSÃO DE TUMORES
DE MAMA, NO MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO E0771**

Belo Horizonte

2024

MARISA SALVI

**PAPEL DAS FIBRAS NERVOSAS SENSORIAIS NA PROGRESSÃO DE TUMORES
DE MAMA, NO MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO E0771**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular. Área de concentração: Biologia Celular

Orientador (a): Prof. Alexander Birbrair

Co-Orientador: Prof. Geovanni Dantas Cassali

Belo Horizonte

2024

043

Salvi, Marisa.

Papel das fibras nervosas sensoriais na progressão de tumores de mama, no modelo de câncer de mama murino E0771 [manuscrito] / Marisa Salvi. – 2024. 119 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador(a): Prof. Alexander Birbrair. Co-Orientador: Prof. Geovanni Dantas Cassali.

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

1. Biologia Celular. 2. Neoplasias da Mama. 3. Sistema Nervoso. 4. Fibras Nervosas. 5. Microambiente Tumoral. 6. Metástase Neoplásica. I. Alexander Birbrair. II. Cassali, Geovanni Dantas. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARISA SALVI

Às nove horas do dia 16 de fevereiro de 2024, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "PAPEL DAS FIBRAS NERVOSAS SENSORIAIS NA PROGRESSÃO DE TUMORES DE MAMA, NO MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO E0771", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Dr. Geovanni Dantas Cassali, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Geovanni Dantas Cassali	UFMG	Aprovada
Dra. Luciana Maria Silva	Fundação Ezequiel Dias FUNED	Aprovada
Dr. Diego Carlos dos Reis	Instituto de Pesquisa do Câncer (ICR)	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2024.

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Diego Carlos dos Reis**, **Usuário Externo**, em 16/02/2024, às 16:00, 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 **Luciana Maria Silva Lopes**, **Usuário Externo**, em 16/02/2024, às 16:01, 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 **Geovanni Dantas Cassali**, **Professor do Magistério Superior**, em 16/02/2024, às 16:18, 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 **3035845** e o código CRC **A7CB680B**.

Dedico a todas as mulheres que, são rede de apoio, possibilitam que outras mulheres façam ciência em um mundo frequentemente marcado pela misoginia e exclusão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que estiveram comigo em toda a minha trajetória, especialmente aos meus pais biológicos (Dirceo e Inês) e minhas irmãs, em especial a Mônica, minha melhor amiga e parceira de chimarrão de todos os sábados de manhã. A tia Bernadete por todo o apoio. Aos meus pais que a vida me deu, Edísio e Ana, por todo apoio, carinho e amor. A Matheus, por ter estado comigo e me amparado nos momentos difíceis e ter comemorado comigo cada conquista, AMO VOCÊS. A Chica, por me receber todos os dias com os olhinhos mais brilhantes e felizes.

Ao professor Alexander por ter aberto as portas do laboratório e me permitido crescer profissionalmente.

Ao professor Geovanni, por toda a orientação, dedicação, carinho, pela oportunidade de trabalho e competência. Obrigada pelo exemplo e referência profissional.

A Carol e a Beatriz por terem me recebido no laboratório, ficado ao meu lado e acreditado em mim, pelas inúmeras ajudas, contribuições e amizade.

Aos colaboradores desse trabalho, pois não se faz ciência sozinha; ao Daniel Portela pela ajuda com os testes comportamentais, a Professora Paula Peixoto e seus alunos especialmente Igor e Letícia por toda a ajuda durante todo o mestrado, as alunas do Professor Geovanni especialmente a Lize, Evelyn e Fernanda Freitas pela colaboração, a professora Simone e seu aluno Luiz Octávio, a professora Sara e suas alunas especialmente, Bruna, Fran, Lari, Ana Carolina, Gi, Fernanda, Roberta, por toda a ajuda, trocas, amizade e discussões científicas, aos demais colegas de laboratório, eu cresci muito trabalhando com vocês.

Ao Professor Victor pela amizade, parceria, cafés, colaboração e referência profissional.

A Amanda, que além de aluna de Iniciação Científica foi minha parceira de bancada, amiga e colaboradora durante os experimentos, obrigada por todos os ensinamentos.

A Ana Clara, pela amizade, parceria, companheirismo e contribuição profissional. Ao Guilherme, pelo carinho, cuidado, amizade e parceria, vocês foram os presentes lindos que o mestrado me deu.

A Julia, Ste, Oscar, Camila, Luana Bahia, Irlandia e Lu pela amizade de tantos anos. Aos meus professores da graduação e grandes mestres inspiradores, Marcus e Carlos, por toda a parceria durante estes anos.

A todas as amigas feitas durante o mestrado especialmente a Jennifer, Jessica e Rúbia.

A cada um (a) que esteve e cuidou de mim em cada momento.

“Por ser mulher, devo fazer esforços incomuns para ter sucesso.

Se eu falhar, ninguém dirá: “Ela não tem o que é preciso.

Eles dirão: As mulheres não têm o que é preciso. “

-Clare Boothe Luce

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microambiente Tecidual sob a orientação do Professor Alexander Birbrair e no Laboratório de Patologia Comparada sob a orientação do Professor Geovanni Dantas Cassali, ambos do Departamento de Patologia Geral – ICB / UFMG, com apoio financeiro da FAPEMIG e Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Imunobiológicos e Biofármacos no Câncer (REMITRIBIC).

RESUMO

O panorama global do câncer, demonstra uma preocupante tendência de aumento nos novos casos, quase dobrando em 2020 em comparação a 2000, além do significativo aumento nas mortes, representando em média uma a cada seis em 2020. O número de mulheres diagnosticadas com câncer de mama saltou de 2,3 milhões no início de 2020 para 7,8 milhões no final do mesmo ano, superando o câncer de pulmão. Para o Brasil, o Instituto Nacional do Câncer prevê para o triênio 2023-2025 mais de 74 mil novos casos de câncer de mama por ano. Este estudo exploratório investigou os efeitos da ativação das fibras nervosas sensoriais Nav1.8, no contexto do câncer de mama. Utilizando o modelo de camundongo Nav1.8-Cre+/hM3Dq, onde as fibras nervosas sensoriais foram estimuladas através da administração de CNO (clozapina-N-óxido). O experimento consistiu na inoculação ortotópica de células E0771 no tecido adiposo mamário de camundongos, sendo estes, avaliados aos 28 dias após a inoculação das células. Os resultados indicaram que a ativação das fibras nervosas sensoriais Nav1.8 provocaram alterações notáveis no microambiente tumoral, além de modificação significativa no volume tumoral, em resposta à ativação dessas fibras. Além disso, houve uma notável reconfiguração na expressão de moléculas chave no mecanismo de transição epitélio mesenquimal, como E-caderina, N-caderina, Fibronectina e nas fibras colágenas da matriz extracelular. As ativações das fibras nervosas sensoriais também exerceram influência sobre as taxas de proliferação celular. De maneira intrigante, o estudo revelou alterações nas metástases hepáticas e sugeriu uma possível migração de células tumorais para o pulmão. Através de técnicas de quantificação de captação de radiação utilizando complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) radiomarcado com ^{99}Tc , não foi observado quantificações significativas de metástase em órgãos distantes, tais como, pâncreas, cérebro, baço e coração, porém, cabe análises mais aprofundadas sobre a formação de sítios metastáticos nesse modelo. Esses resultados ressaltam a importância crítica da inervação sensorial na progressão do câncer de mama.

Palavras chave: biologia celular; neoplasias da mama; sistema nervoso; fibras nervosas; microambiente tumoral; metástase.

ABSTRACT

The global cancer panorama demonstrates a worrying upward trend in new cases, almost doubling in 2020 compared to 2000, in addition to the significant increase in deaths, representing on average one in every six in 2020. The number of women diagnosed with breast cancer jumped from 2.3 million at the beginning of 2020 to 7.8 million at the end of the same year, surpassing lung cancer. For Brazil, the National Cancer Institute forecasts for the triennium 2023-2025 more than 74,000 new cases of breast cancer per year. This exploratory study investigated the effects of activating Nav1.8 sensory nerve fibers in the context of breast cancer. Using the Nav1.8-Cre+/hM3Dq mouse model, where sensory nerve fibers were stimulated through the administration of CNO (clozapine-N-oxide). The experiment consisted of the orthotopic inoculation of E0771 cells in the mammary adipose tissue of mice, which were evaluated 28 days after cell inoculation. The results indicated that the activation of Nav1.8 sensory nerve fibers caused remarkable changes in the tumor microenvironment, in addition to a significant change in tumor volume, in response to the activation of these fibers. Furthermore, there was a notable reconfiguration in the expression of key molecules in the epithelial mesenchymal transition mechanism, such as E-cadherin, N-cadherin, Fibronectin and collagen fibers of the extracellular matrix. The activation of sensory nerve fibers also influenced cell proliferation rates. Intriguingly, the study revealed changes in liver metastases and suggested a possible migration of tumor cells to the lung. Through radiation uptake quantification techniques using HYNIC- β Ala-Bombesin(7-14) peptide complex radiolabeled with ^{99}Tc , no significant quantifications of metastasis were observed in distant organs, such as pancreas, brain, spleen and heart, however, further analysis of the formation of metastatic sites in this model are indicated. These results highlight the critical importance of sensory innervation in the progression of breast cancer.

Keywords: cell biology; breast neoplasms; nervous system; nerve fibers; tumor microenvironment; metastasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

µg - Microgramas

µL - Microlitro

6OHDA - dopamina mimética 6-hidroxidopamina

ANOVA - Análise de variância

ATCC - American Type Culture Collection / Coleção de Cultura Americana

BMP - Bone Morphogenetic Protein / Proteína Morfogenética Óssea

BRCA1 - Gene 1 do Câncer de Mama

BRCA2 - Gene 2 do Câncer de Mama

CAFs - Fibroblastos Associados Ao Câncer

CAPI - Centro de Aquisição e Processamento de Imagens

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CNO - Clozapina-N-Óxido

DC - Células Dendríticas

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DREADDs - Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs / Receptores de Design Ativados Exclusivamente por Drogas de Design

DRG - Dorsal Root Ganglion/ Gânglio Da Raiz Dorsal

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic Acid / Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EGF - Fator De Crescimento Epidérmico

FGF2 - Fator De Crescimento De Fibroblastos 2

GABAAr - Receptor Do Ácido Gama-Aminobutírico

HER2 - Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 / Receptor Tipo 2 Do Fator De Crescimento Epidérmico Humano

IARC International Agency for Research on Cancer/ Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IDH - Índice de Desenvolvimento Humano

IFN-γ - Interferon gama

IL-10 - Interleucina 10

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

INCA - Instituto Nacional do Câncer

M1R - Receptor Muscarínico De Acetilcolina 1

M3R - Receptor Muscarínico De Acetilcolina 3

MEC - Matriz Extracelular

Mg - Miligrama

mL - Mililitro

mm - Milímetros

MMP - Metaloprotease De Matriz

MMP-1 - Metaloprotease De Matriz 1

MMP-7 - Metaloprotease De Matriz 7

MMP-10 - Metaloprotease De Matriz 10

MMP-11 - Metaloprotease De Matriz 11

MMP-14 - Metaloprotease De Matriz 14

NK - Natural Killers / Assassinas Naturais nm - Nanômetro

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

PET-CT - Tomografia Computadorizada-Tomografia Por Emissão De Pósitrons

pH - potencial hidrogeniônico

PNI - Invasão Perineural

PTEN - Homólogo de Fosfatase e Tensina

RE - Receptor De Estrógeno

TRPV1 - transient receptor potential vanilloid type 1/ receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1

RNA - Ácido ribonucleico

RNase - Enzima Ribonuclease

RP - Receptor de Progesterona

RTX - Resiniferatoxina

RTX - Resiniferatoxin

SFB - Soro fetal bovino

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

TCR - T Cell Receptor / Receptor de célula T

TEBs - Botões Terminais Proliferativos

TEM - Transição Epitélio-Mesenquimal

TGF- β - Tissue Growth Factor / Fator de Crescimento Tecidual beta

TME - Transição Mesênquima-Epitélio

TNBC - Triple Negative Breast Cancer / Câncer de mama triplo negativo

TP53 - Proteína Tumoral 53

Tregs - linfócitos T reguladores

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor / Fator De Crescimento Endotelial

VGSC - Voltage-Gated Sodium Channels / Canais de Sódio Dependentes de Voltagem

WT - Wild Type / Selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência e estimativa de morte causadas pelo câncer no mundo a cada 100.000 pessoas.

Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023, para homens e mulheres.

Figura 3: Estrutura mamária e classificação histopatológica do câncer de mama.

Figura 4: Características do câncer.

Figura 5: Impacto das células imunológicas no microambiente tumoral.

Figura 6: Representação do complexo microambiente tumoral.

Figura 7: Representação da plasticidade epitélio-mesênquima na formação de metástases.

Figura 8: Estados de transição TEM típicos na progressão do carcinoma e disseminação metastática.

Figura 9: Cascata metastática do câncer de mama.

Figura 10: Identificação das glândulas mamárias de camundongos.

Figura 11: Montagens inteiras de glândula mamária de camundongo.

Figura 12: Crosstalk nervo-tumor.

Figura 13: Estrutura molecular do canal Nav 1.8

Figura 14: Comparação entre as moléculas de clozapina e Clozapina N- Óxido.

Figura 15: Tumores E0771 apresentam características de tumores triplo negativos.

Figura 16: CNO ativa as fibras nervosas sensoriais dos animais Nav1.8Cre⁺/hM3Dq.

Figura 17: A ativação das fibras nervosas sensoriais Nav1.8 altera o volume tumoral.

Figura 18: Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de E-caderina, N-caderina no microambiente tumoral.

Figura 19: Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de Fibronectina no microambiente tumoral.

Figura 20: Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de fibras colágenas no microambiente tumoral.

Figura 21: A ativação das fibras nervosas sensoriais altera as taxas de proliferação celular, mas não altera as taxas de angiogênese.

Figura 22: A ativação das fibras nervosas sensoriais altera metástases hepáticas e sugere migração de células tumorais para o pulmão.

Figura 23: Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais não foram observadas metástases ósseas, pancreáticas, renais, cerebrais, esplênicas e cardíacas por técnica de coloração de Eosina e Hematoxilina.

Figura 24: Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) nos tumores primários E0771 aos 21 dias 6 horas após a injeção.

Figura 25: Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) nos tumores primários E0771 aos 28 dias 6 horas após a injeção.

Figura 26: Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) em vários órgãos distantes do sítio primário - análise ex vivo.

Figura 27: Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), *ex vivo*, em camundongos fêmeas Nav1.8Cre+/hM3Dq e Nav1.8Cre-/hM3Dq com tumor de mama E0771 aos 28 dias.

Figura 28: Imagem, por microscopia confocal, mostrando a inervação sensorial em fluorescência vermelha em tumores primários no 28º dia após a injeção.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Canais dependentes de Na⁺, genes de expressão, localização de expressão tecidual.

Tabela 2: Anticorpos primários utilizados na imunofluorescência.

Tabela 3: Anticorpos secundários utilizados na imunofluorescência.

Tabela 4: Anticorpos utilizados na imunohistoquímica.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Câncer de mama	22
2.2 Microambiente tumoral	27
2.3 Transição Epitélio-Mesênquima.....	32
2.4 Metástase no câncer de mama	35
2.5 Parênquima mamário de camundongos	38
2.6 INERVAÇÃO E CÂNCER	41
2.7.1 Canais Dependentes de Sódio Voltagem (VGSCs).....	46
2.7.1.1 Canais Nav 1.8.....	48
2.8 DREADDS	49
2.8.1 Gq-DREADDs.....	50
2.9 CLOZAPINA N ÓXIDO - CNO	51
2.10 CÉLULAS E0771.....	53
3 JUSTIFICATIVA	56
4 OBJETIVOS.....	58
4.1 Objetivo Geral	58
4.2 Objetivos Específicos	58
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
5.1 Animais.....	59
5.2 Manutenção dos animais	59
5.3 Genotipagem para hM3Dq e Nav 1.8.....	59
5.4 Linhagem celular e cultura	60
5.5 Análise do crescimento tumoral in vivo	60
5.6 Ativação da inervação sensorial	60
5.7 Imunofluorescência e microscopia	61
5.8 Imuno-Histoquímica.....	62
5.9 Análise Histopatológica.....	63
5.10 Coloração de PicroSirius Red.....	63
5.11.1 Radiomarcagem para teste de afinidade do HYNIC- β Ala-Bombesina (99m Tc) pelas células tumorais E0771.....	64
5.11.2 Rendimento da Radiomarcagem	64
5.11.3 Estudo da biodistribuição in vivo	64
5.11.4 Estudo da biodistribuição ex vivo	65
5.12 Análise estatística	65
6. RESULTADOS	66
Tumores E0771 apresentam características de tumores triplo negativos	66
CNO ativa as fibras nervosas sensoriais dos animais Nav1.8	68

A ativação das fibras nervosas sensoriais Nav1.8 altera o volume tumoral.....	70
Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de E-caderina, N-caderina no microambiente tumoral.....	72
Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de Fibronectina no microambiente tumoral.....	74
Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de fibras colágenas no microambiente tumoral.....	75
A ativação das fibras nervosas sensoriais altera as taxas de proliferação celular, mas não altera taxas de angiogênese.....	78
A ativação das fibras nervosas sensoriais altera metástases hepáticas, porém não foram observadas alterações em demais órgãos.....	80
Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais não foram observadas metástases ósseas, pancreáticas, renais, cerebrais, esplênicas e cardíacas	82
Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico 99mTc-HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) nos tumores primários E0771 aos 21 e 28 dias dias 6 horas após a injeção	84
Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico 99mTc-HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) em vários órgãos distantes do sítio primário - análise ex vivo	86
Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico 99mTc-HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) em vários órgãos distantes do sítio primário	88
7. DISCUSSÃO	90
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	99
9 REFERÊNCIAS	100
10. ANEXO	116

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o cenário global do câncer está mudando. É alarmante o número de novos casos sendo quase o dobro em 2020, em relação ao ano de 2000. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) o elevado número de mortes vem aumentando significativamente, no ano de 2020 em média uma a cada seis mortes foram provocadas por câncer. Segundo a OMS (2021), no início de 2020 havia 2,3 milhões de mulheres diagnosticadas com câncer de mama no mundo, ao final de 2020 esse número passou a ser de 7,8 milhões.

Além disso, o câncer de mama ultrapassou o câncer de pulmão como câncer mais comumente diagnosticado. Segundo a OMS (2021), no início de 2020 havia 2,3 milhões de mulheres diagnosticadas com câncer de mama no mundo, ao final de 2020 esse número passou a ser de 7,8 milhões. Segundo o INCA (2021), a incidência de câncer de mama em mulheres é de 43,74 casos por cada 100 mulheres. A estimativa é que para cada ano do triênio 2023-2025 ocorrerá cerca de 75 mil novos casos de câncer de mama por ano (Brasil, 2023).

O câncer de mama surge nas células de revestimento dos ductos ou lóbulos no tecido glandular da mama. Um dos motivos da complexidade do câncer de mama é devido ao seu microambiente composto não só das células cancerígenas, mas também por uma variedade de células como células imunes, do estroma, vasos sanguíneos e linfáticos, pericitos, fibroblastos, (Soyasal et al., 2015; Petitprez et al., 2018), nervos, entre outros (Pundavela et al., 2015; Perrot et al., 2020; Barr et al., 2021; Han et al., 2021).

Os nervos sensoriais possuem vários canais de sódio dependentes de voltagem (VGSC) que estão associados a respostas térmicas, mecânicas e químicas (Miao et al., 2010; Isom 2001; Felts et al., 1997; Djouhri et al., 2003). O subconjunto Nav1.8 do VGSC consiste em poros com duas subunidades α que auxiliam na excitabilidade dos neurônios sensoriais (Stirling et al., 2005; Djouhri et al., 2003).

O Nav1.8 é considerado um nociceptor presente no gânglio da raiz dorsal (DRG) e em cerca de dois terços dos corpos sensitivos aferentes do gânglio nodal (Gautron et al., 2011; Stirling et al., 2005; Djouhri et al., 2003). Este VGSC pode ser mais encontrado no 1º e 2º nível espinhal sacral (S1 e S2), quase 72%, e em menor quantidade no 4º, 5º e 6º nível espinhal lombar (L4, L5 e L6) quase 61% (Minett et al., 2014). Além disso, o Nav1.8 está associado a nervos periféricos que estão exclusivamente em neurônios sensoriais, mas não no sistema nervoso central (Miao et al., 2010; Akopian et al., 1996).

A mama é um órgão densamente innervado por fibras sensitivas, principalmente na pele e região dos mamilos, e fibras simpáticas, nos vasos sanguíneos e ductos (Q. Zhao et al., 2014; Miao et al., 2010; Pundavela et al., 2015; Sarhadi et al., 1996). Estudos anteriores como de Pundavela e colegas em 2015, demonstraram que a presença de fibras nervosas sensoriais está relacionada a um pior prognóstico de câncer de mama e potencial metastático com maior taxa de invasão de linfonodos. Em contrapartida, um estudo publicado por Erin e colegas em 2022, demonstraram que após a ativação da inervação sensorial através dos receptores de TRPV1 em um modelo de câncer de mama murino, houve uma diminuição da disseminação metastática e um aumento de células imunes nos tumores primários.

O foco principal da nossa pesquisa é compreender como o sistema nervoso controla o câncer no interior do organismo. Tem-se conhecimento da presença de inervação simpática, parassimpática e sensorial no interior do microambiente. Nosso grupo demonstrou anteriormente tanto em Prazeres e colaboradores em 2020 como em Costa e colaboradores, em 2022, que nervos sensoriais penetram no tumor e influenciam no comportamento dos mesmos, contudo, as interações destes nervos com os demais componentes do microambiente tumoral não estão bem caracterizadas na literatura. Sendo assim, torna-se necessário compreender as interações dos nervos sensoriais com o microambiente tumoral e sua participação na progressão dos tumores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de mama

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) demonstrou recentemente que o câncer de mama feminino se tornou o tipo de câncer mais comumente diagnosticado no mundo, conforme disposto na figura 1. No ano de 2020, cerca de 2,3 milhões (11,7%) de mulheres receberam novos diagnósticos de câncer de mama, seguido pelo câncer de pulmão, com 2,2 milhões (11,4%); cólon e reto, com 1,9 milhão (10,0%); próstata, com 1,4 milhão (7,3%); e pele não melanoma, com 1,2 milhão (6,2%) de casos novos. Em 2020 ocorreram cerca de 685 mil mortes em decorrência de câncer de mama, sendo essa a causa mais comum de morte por câncer em mulheres e a quinta causa mais comum de mortes por câncer no geral, conforme a figura 1(WHO, 2020).

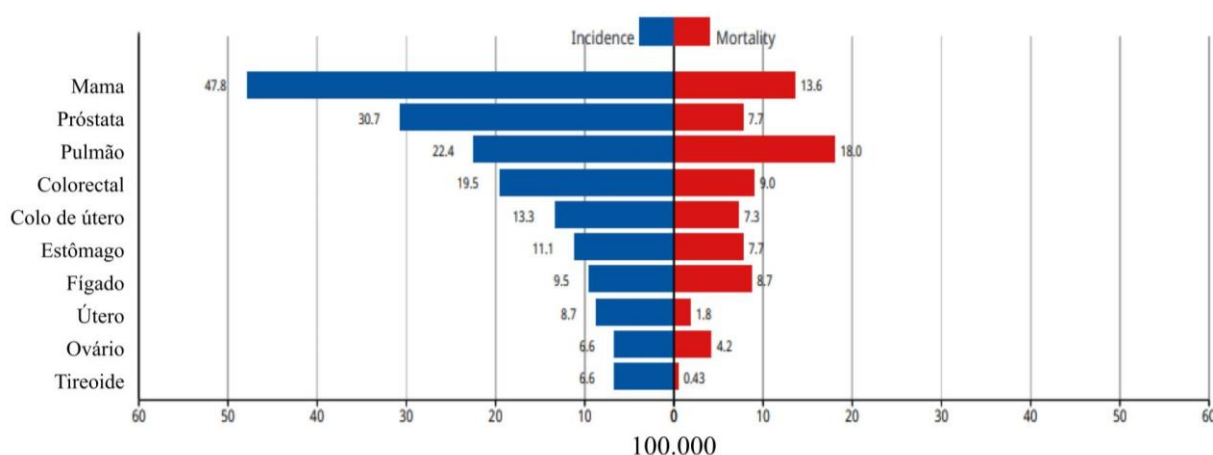


Figura 1: Incidência e estimativa de morte causadas pelo câncer no mundo a cada 100.000 pessoas: ambos os sexos Fonte: IARC, 2020. Adaptada.

No Brasil, o câncer de mama é o mais incidente na população feminina em todas as regiões do país. Nas regiões com maior IDH, os cânceres de cólon e reto são o segundo ou terceiro mais frequente, mas, nas regiões de menor IDH, o câncer do colo do útero permanece na segunda posição. Em termos de mortalidade no Brasil, ocorreram em 2020 17.825 mortes por câncer de mama, o equivalente a 16,47 mortes a cada 100 mil mulheres.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023, para homens e mulheres. Fonte: INCA, 2023.

Segundo a OMS (2021), no início de 2020 havia 2,3 milhões de mulheres diagnosticadas com câncer de mama no mundo, e ao final de 2020 esse número passou a ser de 7,8 milhões. De acordo com o INCA (2021), a incidência de câncer de mama em mulheres é de 43,74 casos por cada 100 mulheres. Para o triênio 2023-2025 ocorrerão 704 mil casos novos de câncer por ano, 483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Esse, é estimado como o mais incidente, com 220 mil casos novos (31,3%), seguido pelos cânceres de mama, com 75 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, com 46 mil (6,5%), seguido pelo câncer de pulmão, com 32 mil (4,6%).

Algumas condições podem ser determinantes para o desenvolvimento do câncer de mama, como: fatores genéticos, hormonais, ambientais e comportamentais, menarca precoce, falta de aleitamento materno, menopausa tardia, gravidez em idade avançada, uso de álcool, falta de exercício físico, (Danaei, *et al.*, 2005; Harbeck, *et al.*, 2019) mutações em genes como TP53 (Proteína Tumoral 53), BRCA1 (Gene 1 do Câncer de Mama), BRCA2 (Gene 2 do Câncer de Mama) e PTEN (Homólogo de Fosfatase e Tensina) também influenciam a predisposição para o desenvolvimento de tumores mamários (Shiovitz & Korde, 2015).

Os números significativamente altos tanto no número de casos quanto no número de mortes se dá, muito provavelmente, pelas muitas entidades biológicas caracterizadas pela heterogeneidade na patologia, pelas alterações na expressão gênica e pelas características do microambiente tumoral (Nolan et al, 2023).

O microambiente tumoral mamário dá início nos ductos ou lóbulos mamários, conforme figura 3-a, sendo um processo heterogêneo, a depender da classificação, pode ocorrer extravasamento para o estroma circundante (Sims, *et al.*, 2007; Provenzano et al, 2018).

Sendo assim, parâmetros classificatórios são utilizados para determinar e classificar esses tumores. Entre os principais parâmetros estão: tamanho e grau do tumor, envolvimento

nodal, tipo histológico, podendo ser classificado como carcinoma ductal e ou lobular, ambas são lesões invasivas, caracterizadas por alta heterogeneidade celular, baixa taxa de sobrevivência e probabilidade aumentada de desenvolvimento de metástases (Bombonati & Sgroi, 2011; Harbeck; *et al.*, 2019), suas respectivas lesões pré-invasivas, o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma lobular *in situ*, apresentam uma proliferação epitelial atípica, conforme esquema representativo na figura 3-b, mais uma membrana basal intacta, impedindo a invasão das células tumorais aos tecidos adjacentes (Harbeck, *et al*, 2019) e expressão de marcadores que atualmente são usados para orientar as decisões de tratamento (Provenzano et al, 2018).

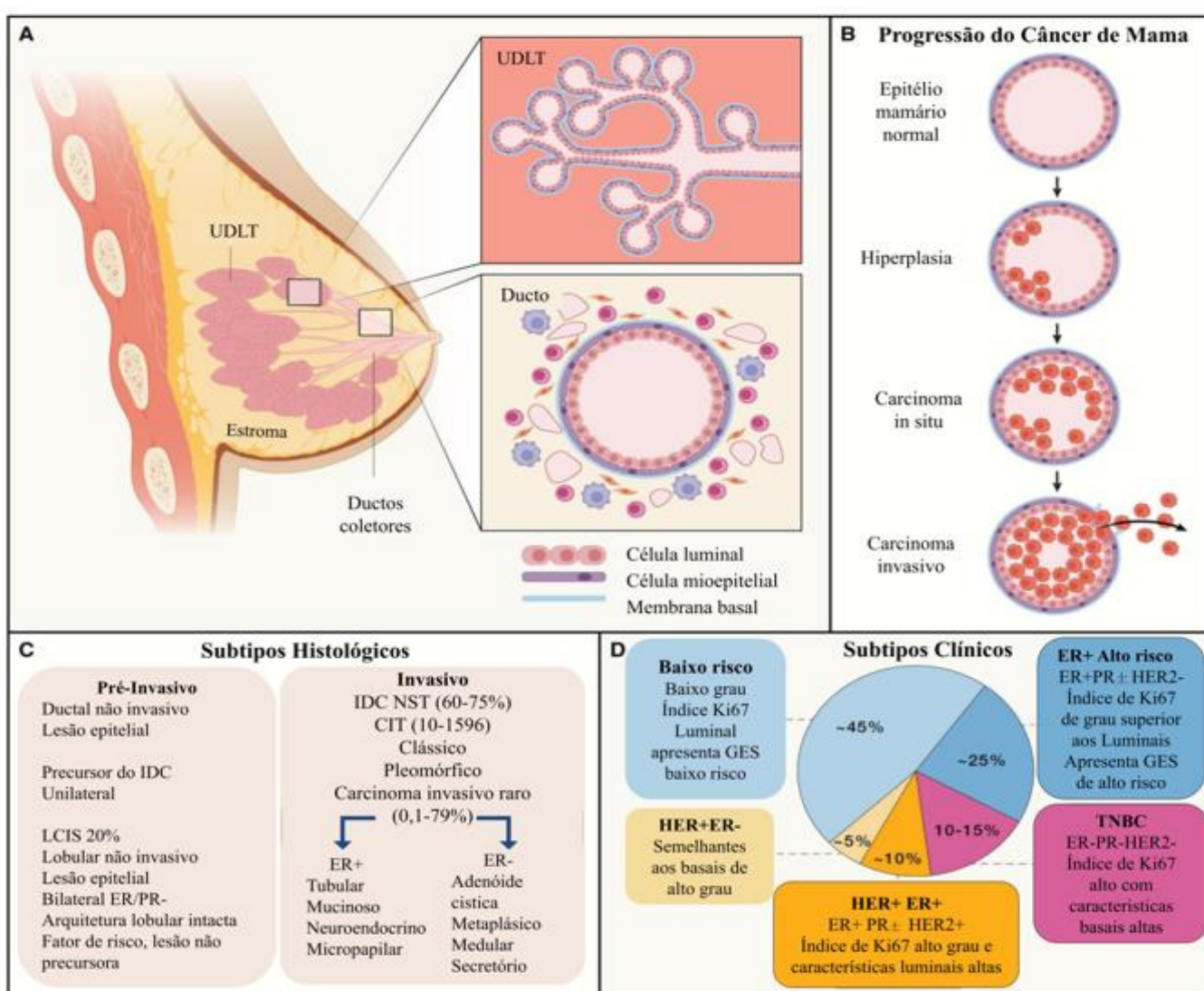


Figura 3: Estrutura mamária e classificação histopatológica do câncer de mama. (A) Representação esquemática da mama humana, representando a unidade ductal lobular terminal, unidade funcional da mama onde surge a maioria dos tumores. Os ductos mamários consistem em um epitélio de duas camadas de células luminas e mioepiteliais, cercado por um estroma imunológico, fibroblástico e rico em adipócitos que influencia tanto a fisiologia normal da mama quanto a carcinogênese. (B) Modelo simplificado de patogênese do câncer de mama.

A proliferação de células anormais do epitélio ductal ou lobular pode levar a lesões pré-invasivas denominadas carcinoma *in situ*. Uma vez que as células tumorais rompem a membrana basal e se infiltram no estroma circundante, o câncer é classificado como carcinoma invasivo. (C) Visão geral dos principais subtipos histológicos de lesões pré-invasivas e carcinomas de mama invasivos. O carcinoma ductal invasivo “sem tipo especial” é responsável pela grande maioria dos tumores de mama. Aproximadamente 15% a 25% dos cânceres invasivos são caracterizados por padrões de crescimento e características citológicas distintas. (D) Comparação dos principais subtipos clínicos de câncer de mama, com base principalmente nas características histológicas e na expressão imuno-histoquímica do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e do marcador de proliferação Ki67. Fonte: Nolan et al., 2023. Adaptada.

Na clínica, tem sido utilizada uma classificação histológica-molecular, que caracteriza os tumores em cinco subtipos de acordo com a presença ou ausência de receptores hormonais de estrogênio (RE), progesterona (RP) e fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Os subtipos são: Triplo Negativo, HER2-enriquecido, Luminal B-HER2+, Luminal B-HER2- e Luminal A (Harbeck, *et al*, 2019), como esquematizado na Figura 3-c e d

Entre os tipos de câncer de mama, um subtipo bastante citado na literatura e recorrente na clínica é o triplo-negativo (TNBC), muito pelas suas características agressivas, sendo identificado entre 10 e 20% dos carcinomas invasivos de mama, mais comum em mulheres com menos de 50 anos, sendo um dos subtipos que mais carece de tratamento efetivo (Zagami et al, 2022). Esses tumores são caracterizados pela ausência de receptores hormonais de estrogênio (RE), progesterona (RP) e a ausência de superexpressão do HER2. Sua agressividade está intimamente relacionada com a heterogeneidade molecular, com altas taxas de mutações genéticas e presença aumentada de células tronco tumorais, tornando-o mais quimiorresistente (Thike, *et al.*, 2010).

Além dos tumores triplo-negativos, ainda são bastante recorrentes os subtipos classificados como Luminal A e B. O subtipo Luminal A é caracterizado pela presença dos receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR) e apresenta baixa marcação para proliferação celular (Ki-67) (menor que 20%). Clinicamente, manifesta-se com baixo grau, crescimento lento, além de apresentar melhor prognóstico, menor incidência de recidiva e maior taxa de sobrevida. Quando ocorrem recidivas, essas são mais frequentes ao nível ósseo, com menores taxas de recidivas viscerais e do sistema nervoso central (SNC). Da mesma forma, apresentam maior sobrevida em caso de recaída (Orrantia-Borunda et al, 2022).

Já o subtipo Luminal B, constitui de 10 a 20% dos tumores do tipo luminal, são de grau superior e apresentam pior prognóstico em relação ao Luminal A. São positivos para RE, podem ser negativos para RP e apresentam elevada expressão de Ki-67 (maior que 20%) e crescimento

mais rápido que o Luminal A. Por apresentarem receptores hormonais há o indicativo de tratamento com terapias hormonais somadas à quimioterapia quando comparado com o Luminal A. Embora haja a recorrência óssea, esse subtipo costuma apresentar taxa mais elevada de recorrência visceral, sobrevida e recidivas são menores (Orrantia-Borunda et al, 2022).

Um outro subtipo é o HER2+, responsável por 10-15% dos cânceres de mama. É caracterizado pela alta expressão de HER2 e ausência da expressão de ER e PR. Porém o HER2 apresenta alguns subgrupos, sendo eles: HER2 luminal (RE+, RP+, HER2+ e Ki-67:15–30%) e enriquecido com HER2 (HER2+, RE-, RP-, Ki-67>30%). Possui crescimento mais rápido que os luminais, maior agressividade e pior prognóstico. Comumente ocorrem metástases ósseas, e as recidivas viscerais também são mais frequentes neste subtipo em comparação com os luminais (Orrantia-Borunda et al, 2022).

A agressividade de todos esses subtipos citados muito se dá pelo seu microambiente tumoral dado que é um importante influente para o comportamento heterogêneo desses tumores, uma vez que fatores intrínsecos e extrínsecos exercem diversas formas de pressão seletiva sobre as células tumorais e aumentam a instabilidade genômica, características marcantes dos tumores de mama. Contudo, esses elementos não são exclusivos, agindo de maneira sinérgica para estabelecer um sistema complexo com diversas camadas de heterogeneidade, fundamentadas nas distintas características genéticas, epigenéticas, transcriptômicas, proteômicas e funcionais dos diferentes subtipos celulares. Para além da heterogeneidade do microambiente tumoral, existe também a heterogeneidade intertumoral, que é sinalizada por meio das disparidades fenotípicas e moleculares entre tumores de pacientes distintos, mesmo quando compartilham o mesmo subtipo da doença (Lawson, *et al.*, 2018; Guo et al, 2023).

Além do microambiente ser bastante diverso e heterogêneo, a dificuldade no diagnóstico, diagnóstico tardio e a falta de tratamentos eficazes implicam diretamente nas altas taxas de mortalidade das pacientes. Além disso, a maioria dos métodos de tratamentos não se baseia na terapia personalizada, que é um fator crucial, pois considera tanto a heterogeneidade intratumoral quanto a intertumoral. Essa falta de individualização, se torna um dos maiores problemas enfrentados atualmente nos tratamentos de câncer de mama e por isso um dos motivos dos insucessos nos tratamentos, bem como do aumento de recorrência e mortes (Hanahan & Coussens; 2012; Wang, *et al.*, 2017).

Com os recentes avanços na área da saúde, tornaram-se possíveis as avaliações prognósticas por meio de análises moleculares das neoplasias, estas de extrema importância para o tratamento individualizado e escolha de terapia sistêmica que seja mais apropriada para

cada paciente, levando em consideração os fatores relacionados a risco aumentado ou diminuído de recidiva após o tratamento (Harbeck, *et al*, 2019; Winters, *et al*, 2017).

2.2 Microambiente tumoral

As células tumorais ou células cancerosas são as principais componentes deste microambiente. As células tumorais manifestam modificações genéticas adquiridas à medida que passam da normalidade aos estados de crescimento neoplásico, os chamados *hallmarks of cancer* (marcas do câncer, em tradução livre). Como evidenciado pela figura 4, as oito características do câncer são: 1) sustentação dos sinais de proliferação; 2) evasão de supressores de crescimento; 3) ativação de invasão e metástase; 4) indução de angiogênese; 5) imortalidade replicativa; 6) resistência a morte celular; 7) reprogramação do metabolismo celular; 8) evasão da destruição imunológica (Hanahan & Weinberg, 2011). Duas características facilitadoras, “instabilidade do genoma” e “inflamação promotora de tumor” foram adicionadas recentemente a essa lista (Hanahan, 2022).



Figura 4: **Características do câncer.** As células cancerosas adquirem modificações genéticas que propiciam vantagens, esses atributos foram nomeados como “*hallmarks of cancer*”. Fonte: Hanahan, 2022. Adaptada.

Contudo, os tumores não são compostos apenas de células cancerosas e sim por uma variedade de outras células, como células do estroma, células imunes, células endoteliais e pericitos, fibras nervosas, fibroblastos e demais componentes da matriz extracelular como fibras colágenas. O microambiente tumoral é então definido por esse conjunto de células que interagem entre si, de forma que, principalmente as células tumorais, passem a regê-lo com o objetivo de favorecer a sua sobrevivência e progressão tumoral (Quail & Joyce, 2013; Barcus & Longmore, 2021).

Além das células tumorais, um dos grupos de células críticos do microambiente tumoral são as células imunes. A depender do contexto, existe uma oposição na relação entre células imunes e o microambiente tumoral, em alguns contextos elas podem ser pró tumorigênicas ou imunossupressoras (Anderson & Simon, 2020).

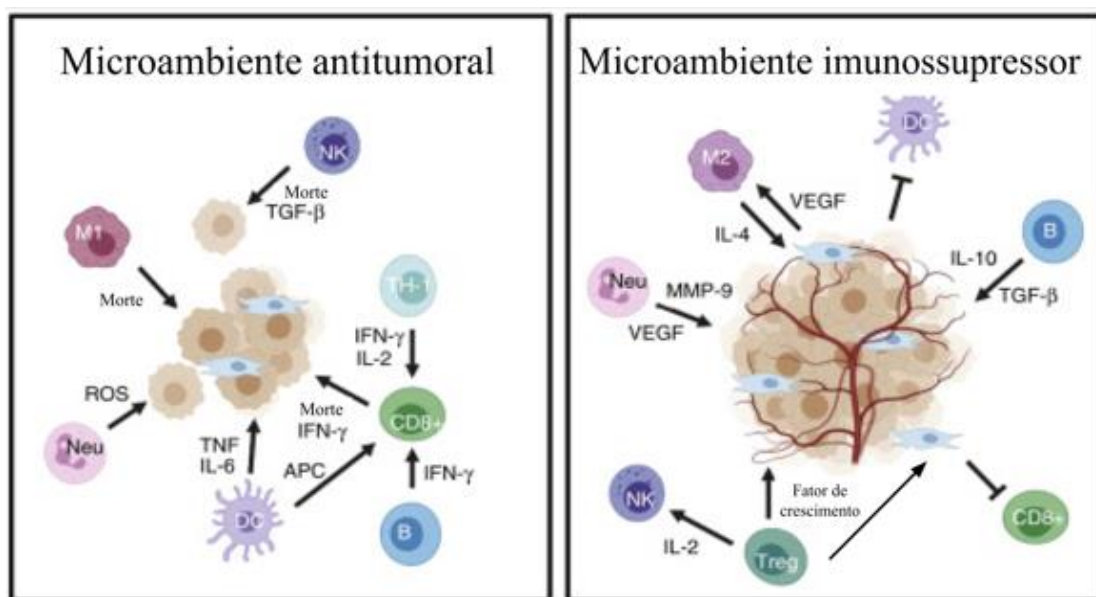


Figura 5: Impacto das células imunológicas no microambiente tumoral. O papel das células imunes no microambiente tumoral pode ser suprimir a formação do tumor ou promover a tumorigênese. Dependendo do contexto e do tipo de tumor, as células imunes podem ser pró ou antitumorigênicas. Fonte: Anderson & Simon, 2020. Adaptada.

Entre as células imunes presentes no microambiente tumoral, um dos grupos que ganham destaque são as linfócitos T. Essas células desenvolvem seu próprio receptor (TCR). Existem várias populações distintas de linfócitos T, os linfócitos T citotóxicos (CD8) e (CD4). As células TCD8+ são capazes de detectar antígenos tumorais anormais expressos em células cancerosas e os direcionam para serem destruídos. A presença de TCD8+ está associada a prognósticos positivos para pacientes com câncer. Além de destruir células tumorais, TCD8+

secretam interferon gama (IFN- γ), citocina capaz de suprimir a angiogênese (Tan, *et al.*, 2011; Jiang & Shapiro, 2014; Soysal et al, 2015).

Já as células TCD4⁺ se diferenciam em dois subtipos: T helper 1 (Th1) e T reguladoras (Tregs), de forma a coordenar uma ampla resposta imune dentro do microambiente tumoral. As células Th-1 são pró-inflamatórias e sustentam as células CD8⁺ através da secreção de interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ . Níveis aumentados de TCD4⁺, costumam estar associados a resultados positivos para o paciente. Em contrapartida as Tregs são necessárias para suprimir as respostas inflamatórias e controlar a autoimunidade. No microambiente tumoral são células onipresentes e promovem o desenvolvimento e a progressão do tumor, diminuindo as respostas antitumorais (Maimela et al, 2019; Anderson & Simão, 2020; Plitas et al, 2020).

Células B são especializadas em produzir anticorpos, apresentar antígenos e secreção de citocinas. Nos tumores, são mais comumente encontradas nas margens e em gânglios linfáticos próximos ou drenantes do tumor. São menos abundantes quando comparadas com os linfócitos T, contudo são importantes durante a tumorigênese (Lee et al, 2016; Sharonov et al, 2020; Anderson & Simão, 2020).

As células NK são outro grupo de células imunes no microambiente tumoral. São divididas em duas classes: as que fazem parte ativamente do processo de morte de células tumorais, porém não são muito eficientes dentro do microambiente tumoral, mas são muito eficientes na morte de células tumorais na corrente sanguínea, e as que realizam secreção de citocinas inflamatórias (Anderson & Simão, 2020).

Já os macrófagos são células abundantes no microambiente tumoral, as populações M1, que possui característica pró-inflamatória, e M2, que possui característica imunossupressora (Solinas, et al, 2009; Quail & Joyce, 2013).

Assim como outras células imunes do microambiente tumoral, os neutrófilos podem ser tanto imunossupressores como pró-tumorigênicos, a depender do tipo do tumor e do estágio de desenvolvimento (Hinshaw & Shevde, 2019).

Por fim, ainda dentro do grupo das células imunes que compõem o microambiente tumoral, existem as células dendríticas (DC), cuja característica inerente é serem antitumorigênicas. Contudo, alguns tumores fazem o recrutamento dessas células para sustentar a progressão tumoral. Isso ocorre devido a algumas citocinas liberadas pelo microambiente tumoral, que fazem com que as células dendríticas tolerem a presença de células tumorais e bloqueiem a indução de uma resposta imune (Soysal, et al, 2015; Anderson & Simão, 2020).

As células do estroma também são componentes essenciais do microambiente tumoral. Os tumores realizam o recrutamento dessas células, que normalmente estão próximas a ele,

provendo sustentação e suporte tecidual para o desenvolvimento tumoral. Compõem as células estromais: células endoteliais, fibroblastos e adipócitos. Uma vez recrutadas para o microambiente tumoral, as células estromais secretam muitos fatores que influenciam a angiogênese, proliferação, invasão e metástase (Turley et al, 2015).

As células endoteliais são as responsáveis por orquestrar a formação de vasos sanguíneos. Durante o início da formação do tumor as células tumorais dependem da difusão passiva para as trocas gasosas e o transporte de nutrientes. Quando o tumor atinge volumes maiores, o oxigênio passa a ser escasso e o microambiente passa a ser mais hipóxico e ácido. Para driblar isso, os tumores desenvolvem seu próprio fornecimento de sangue. A neovascularização é um mecanismo comum usado pelos tumores para cooptar os vasos sanguíneos existentes e induzir o crescimento de novos vasos. Os fatores induzidos pela hipóxia iniciam o brotamento de novos vasos estimulando as células endoteliais a segregar fatores pró-angiogênicos como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e VEGF. As células endoteliais também estão relacionadas com a promoção metastática (Hinshaw & Shevde, 2019; Sobierajska et al, 2020).

Durante a progressão do tumor, as células endoteliais podem sofrer um processo descrito como “transição endotelial-mesenquimal”, e passam então a serem fibroblastos associados ao câncer (CAFs). Essa transição é orquestrada por dois componentes, TGF- β e pela proteína morfogenética óssea (BMP), levando a perda de conexão célula a célula, deslocamento e alongamento, aumento da migração e perda de propriedades endoteliais. Essas novas células (CAFs) são essenciais para estimularem a migração, invasão de células tumorais (De Castro Junior, *et al.*, 2006; Scully, *et al*, 2012; Anderson & Simon, 2020).

Os CAFs são componentes importantes do estroma do microambiente tumoral, pois desempenham um papel crítico na facilitação da interação entre as células cancerosas e o microambiente. Além de serem derivadas de células endoteliais, pericitos e células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea, a grande maioria dos CAFs no microambiente tumoral são procedentes de fibroblastos residentes do tecido, através da secreção de TGF- β , PDGF e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) pelas células estromais, para converter fibroblastos em fibroblastos associados ao câncer. O acúmulo dessas células está normalmente associado a um mau prognóstico para o paciente em vários tipos de câncer, além de haver uma associação a recorrência da doença (Sobierajska et al, 2020).

Os CAFs ainda são responsáveis pela produção da maioria dos componentes extracelulares, incluindo fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular (MEC). Em tumores de origem epitelial, como é o caso dos tumores de mama, a transição

epitélio-mesênquima é uma das etapas críticas da metástase, momento em que as células epiteliais perdem a polaridade celular e as adesões célula-célula e ganham fenótipos migratórios e invasivos (melhor descrito no item 2.3). Uma das formas de facilitar a migração de células cancerosas através do microambiente tumoral, se dá quando os CAFs passam a secretar MMP-3, que degrada a E-caderina para promover a invasão de células cancerígenas (Choi, *et al.*, 2014; Folgueira, *et al.*, 2013; Soysal. *et al.*, 2015).

Um outro grupo de células importantes no microambiente tumoral são os adipócitos, que exercem seus efeitos através da secreção de metabólitos, enzimas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas. São células apoiadoras das células tumorais para promover o crescimento tumoral. Como a mama é composta basicamente por tecido adiposo branco, os adipócitos no microambiente ambiente tumoral mamário são atores críticos. Nesse contexto, as células tumorais podem estimular os adipócitos a sofrerem lipólise, que decompõe os estoques de lipídios, disponibilizando ácidos graxos livres para serem absorvidos pelas células cancerígenas. Posteriormente, as células tumorais usam esses ácidos graxos livres para produção de energia, e para a formação de membrana celular, moléculas bioativas lipídicas e exossomos. Células adiposas também desempenham um papel importante na modificação da matriz extracelular através da secreção de metaloproteinases, como MMP-1, MMP-7, MMP-10, MMP-11 e MMP-14 (Anderson & Simon, 2020).

Por fim, integram o microambiente tumoral os componentes não celulares, que são responsáveis, de modo geral, pela sustentação do tumor. A MEC é composta por colágeno, fibronectina, elastina e laminina e corresponde a cerca de 60% da massa de tumores sólidos. Elevados depósitos de colágeno e alto infiltrado de fibroblastos resultam em desmoplasia, que está fortemente ligada ao mau prognóstico do paciente. Várias células do microambiente tumoral secretam componentes da MEC, embora os CAFs sejam fontes predominantes. As MMPs são proteases que decompõem as proteínas da MEC e são críticas na remodelação da MEC para promoção da progressão tumoral e disseminação metastática (Lu, *et al.*, 2012; Tanjore & Kalluri, 2006).

Além das células do estroma e os componentes da MEC, células imunes e tumorais, o microambiente tumoral conta com a presença de fibras nervosas (HUANG; SU; CUI; SHEN *et al.*, 2014). Nos últimos anos muito tem se falado sobre a interação entre o sistema nervoso periférico (SNP) e a progressão de tumores como: tumores de mama, próstata, pâncreas, colorretal e gástrico (Seifert, *et al.*, 2002; Ayala, *et al.*, 2008; Marchesi, *et al.*, 2010; Pundavela *et al.*, 2015).

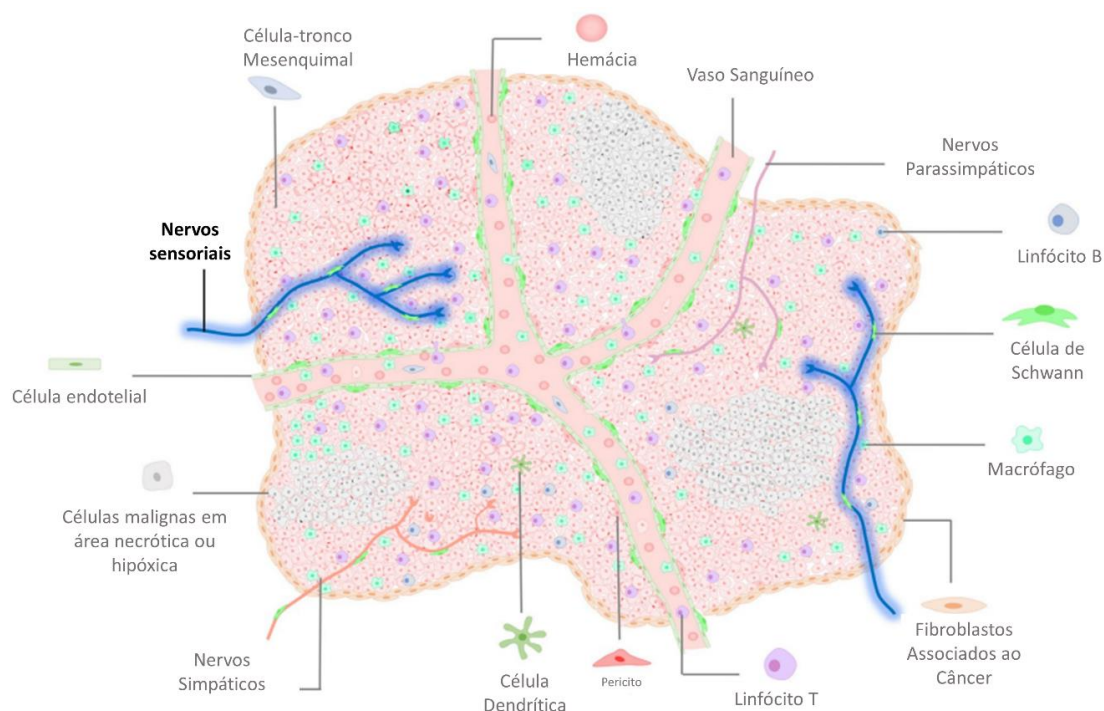


Figura 6:. Representação do complexo microambiente tumoral. Ilustração esquemática mostrando a complexidade do microambiente tumoral com seus componentes conhecidos, delineando um novo elemento, como é o caso da presença de fibras nervosas adentrando ao tumor. Fonte: Prazeres *et al.*, 2020. Adaptada.

Estudos anteriores demonstraram que a presença de fibras nervosas sensoriais está associada a piores prognósticos de câncer de mama e potencial metastático com maior taxa de invasão de linfonodos próximos ao tumor primário e tecido adjacentes (Pundavela, *et al.*, 2015). Em contrapartida, nosso grupo demonstrou anteriormente que em tumores melanoma quando estimulado as fibras nervosas sensoriais os tumores diminuem (Costa et al, 2020).

2.3 Transição Epitélio-Mesênquima

A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo de transdiferenciação no qual as células epiteliais mudam suas características, passando a expressar um perfil mesenquimal. Nesse contexto de mudança de perfil, dinâmico e reversível, as células epiteliais perdem suas características, como junções e polaridade (apical-basal), além de adquirirem capacidade de migrar e invadir tecidos circundantes. Esse processo é governado por mudanças epigenéticas e envolve principalmente a modificação de histonas que regulam a expressão de fatores cruciais da TEM. Um pequeno grupo de genes, são os principais mestres reguladores da TEM, sendo eles: SNAIL, SLUG, TWIST e ZEB (Park et al, 2022).

Existem três tipos de TEM; a TEM tipo 1, que ocorre na durante a embriogênese, TEM tipo 2, que ocorre na cicatrização de feridas, regeneração de feridas e fibrose, e a TEM tipo 3, que ocorre no câncer, conforme a ilustração da figura 7. Nos mais variados tipos de tumores essa TEM contribui para a formação de células tronco cancerosas, resistência terapêutica, escape imunológico e metástases (Manfioletti & Fedele 2022).

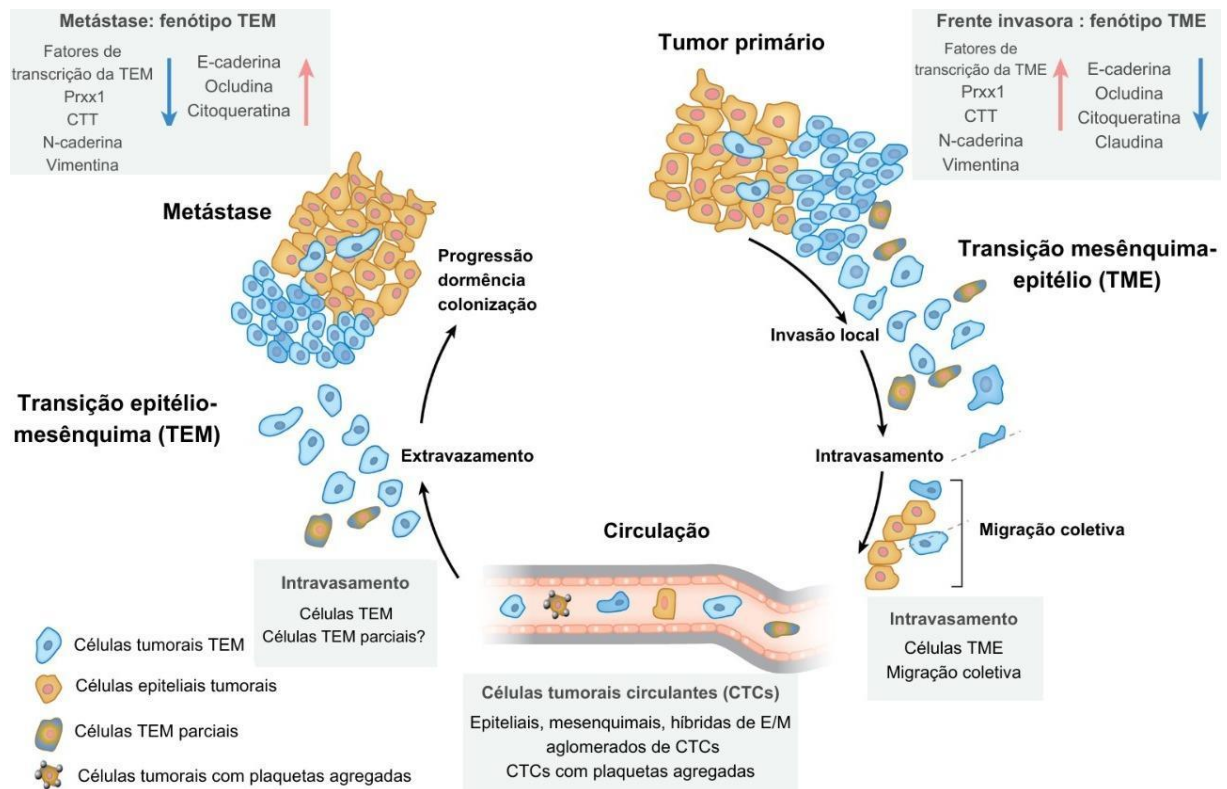


Figura 7: Representação da plasticidade epitélio-mesênquima na formação de metástases. As células cancerígenas submetidas a TEM no tumor primário estão associadas a alterações moleculares e celulares que resultam na perda de adesão célula-célula e polaridade (apical-basal) que promove migração e invasão local, entrada em vasos sanguíneos (intravasamento), sobrevivência como células únicas ou células revestidas com plaquetas, e disseminação pela saída dos vasos (extravasamento) para o parênquima de órgãos específicos distantes. Após a colonização de órgãos metastáticos, as células cancerosas TEM podem se diferenciar novamente em um fenótipo epitélio por TME (transição mesênquima-epitélio), ganhando polaridade (frontal-traseira) através de interações com o microambiente tumoral para progredir para metástases. Fonte: Mittal 2018. Adaptada.

Células epitélio são unidas por meio de junções laterais, ou seja, célula-célula, que podem ser: junções estreitas, junções aderentes, junções comunicantes e desmossomos. Além disso, células epitélio interagem com a membrana basal subjacente através de hemidesmossomos e integrinas (Dongre & Weinberg, 2019).

Tanto as células normais, como as células neoplásicas, que ativam o programa de TEM, normalmente não avançam para um estado totalmente mesenquimal, geralmente prosseguem para um estado parcialmente epitelial e parcialmente mesenquimal, dessa forma expressam uma mistura de marcadores. Sendo assim, a TEM é caracterizada por apresentar células em vários estados celulares, dispostas ao longo do espectro epitelial mesenquimal (Dongre & Weinberg, 2019).

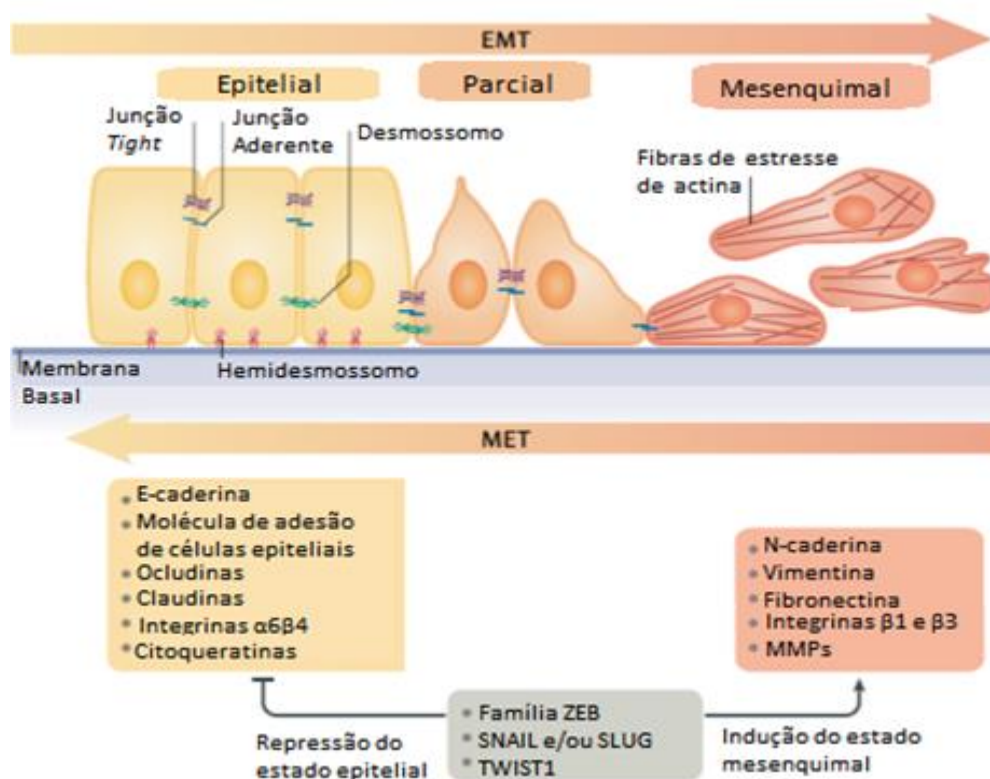


Figura 8: Estados de transição TEM típicos na progressão do carcinoma e disseminação metastática.

Durante a invasão do carcinoma e disseminação metastática, o fenótipo anteriormente epitelial das células tumorais (esquerda), através do processo de TEM pode evoluir para um fenótipo TEM mesenquimal (direita). Geralmente, quanto mais à direita do espectro TEM uma célula está localizada, menor adesão a outras células ela terá. A compensação para este ganho de motilidade é uma diminuição do potencial proliferativo. TME é o processo inverso. É indicado pela seta na parte inferior da figura. Fonte: Dongre & Weinberg, 2019. Adaptada.

Para avaliar o perfil de expressão da célula, ou seja, em qual estado a célula está, alguns marcadores mais comuns são utilizados, entre eles a E-caderina, que tem seu papel relacionado a manutenção da polaridade e integridade epitelial. As moléculas de E-caderina de células adjacentes são unidas através de íons de cálcio, que formam junções aderentes. Na porção intracelular a E-caderina se liga ao citoesqueleto de actina através de cateninas, esse complexo confere estabilidade às junções célula-célula e desencadeia sinais intracelulares (LI; FENG, 2011). No câncer de mama, a expressão diminuída dessa molécula foi associada como um fator

crucial na progressão do câncer de mama e desenvolvimento de metástases, estando associada a um prognóstico ruim (Gould, *et al*, 2006; Herzig, *et al.*, 2007).

Além da E-caderina, outro marcador utilizado é a N-caderina, um marcador de células mesenquimais. A N-caderina induz TEM e características semelhantes às células-tronco cancerígenas, ativando a via ErbB através da regulação positiva do nível de proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento (GRB2), proteína transformadora de SHC e ERK (Loh et al, 2019). A N-caderina é superexpressa no câncer de mama invasivo e metastático. Fatores como TGF- β 1, Wnt/ β -catenina, EGFR e NF- κ B, modulam a expressão dessa proteína em células tumorais. A expressão anormal de N-caderina também foi encontrada em outros tumores como tumores de pulmão, hepáticos, urotelial e de próstata. Na progressão tumoral, foi documentado que a expressão anormal da N-caderina está ligada a malignidades manifestadas por transformação celular, diminuição da apoptose, angiogênese, invasão e metástase (Kaszak et al, 2020).

Além dessas duas caderinas, um outro marcador importante para a avaliação do TEM é a vimentina. A vimentina é uma proteína filamentosa intermediária citoplasmática, onipresente e é expressa em células mesenquimais normais e tem por função manter a integridade celular e fornecer resistência contra o estresse. Recentemente foi incluída como marcador de TEM. A vimentina é super expressa em vários tipos de câncer epitelial, como cânceres de próstata, mama, melanoma, pulmão e tumores gastrointestinais. Essa super expressão de vimentina em tumores está intimamente relacionada com o crescimento acelerado, invasão e mau prognóstico (Satelli et al, 2011). Além disso, a vimentina inibe proteínas associadas à adesão célula-célula (adesão focal) para induzir a migração celular. Consequentemente, na ausência da vimentina, a migração celular é inibida pela adesão focal (Chen et al, 2021).

Essa mudança de perfil que ocorre nas células tumorais é uma das vias importantes para a cascata metastática, tanto para a invasão celular como para a migração (Yilmaz; & Christofori, 2010). No tópico 2.4, o processo de formação metastática é descrito de forma mais detalhada.

2.4 Metástase no câncer de mama

Cerca de 10 a 15% das pacientes com câncer de mama desenvolvem uma forma agressiva da doença, o que significa que há a presença de metástases em órgãos distantes nos 3 primeiros anos após o diagnóstico inicial. Contudo, não é incomum que haja manifestações

metastáticas em tecidos distantes, 10 anos ou mais após a detecção do tumor primário (Weigelt, *et al*, 2005).

A invasão metastática no câncer de mama é um processo complexo pois pode ocorrer tanto em órgãos próximos como em órgãos distantes como osso, pulmões, cérebro e fígado (Kin, 2021).

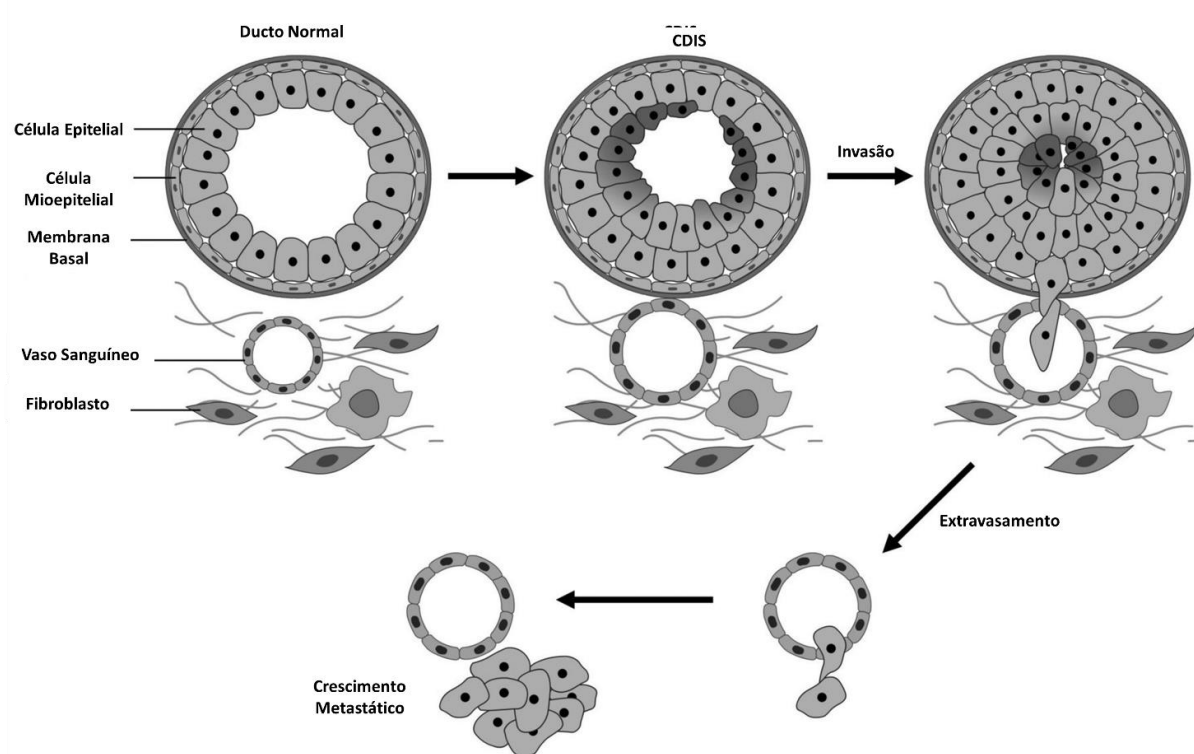


Figura 9: Cascata metastática do câncer de mama. Fonte: Scully, *et al*, 2012. Adaptada.

O processo de invasão do tecido circundante ao tumor primário se inicia com as células tumorais invasivas alterando sua adesão célula a célula e a adesão celular à matriz extracelular (MEC), invasão e extravasamento (figura 9). As moléculas de adesão celular (CAMs) foram descritas como importantes mediadores nesses eventos, sendo cruciais para a formação de metástases do câncer de mama (Li & Feng, 2011; Scully, *et al*, 2012).

O processo de invasão altera completamente a adesão a MEC, essa adesão é mediada por integrinas, proteínas transmembrana como fibronectina e laminina (Mego, *et al*, 2010). A fibronectina na MEC é induzida a se auto associar e a interagir com outras proteínas para formar redes fibrilares (Singh, *et al*, 2010). Já a laminina é indispensável para a formação de redes celulares que se ligam fisicamente aos componentes intra e extracelulares e transmitem sinais críticos para o comportamento celular, e para os polímeros extracelulares que determinam a arquitetura e a fisiologia das membranas basais (Aumailley, 2013).

Para que a célula seja capaz de penetrar o tecido, a MEC precisa ser degradada e isso ocorre através da ação de metaloproteinases (MMPs) e do sistema ativador do plasminogênio da uroquinase (uPA) (Oskarsson 2013). A sinalização das integrinas é capaz de cooperar com a expressão e regulação da atividade das MMPs (Li & Feng, 2011). Começa então a desintegração da adesão célula-célula pela perda de marcadores epiteliais, como a E-caderina, e pela expressão de marcadores mesenquimais, como a vimentina (Aumailley 2013).

Após a invasão (figura 9), as células tumorais migram do tumor primário para o sítio metastático. Nos tumores de mamários, esse processo de migração celular se inicia principalmente em células da borda do tumor primário, criando micro trilhas semelhante a tubos, clivando e orientando as as fibras colágenas, principalmente fibras do tipo 1, para subsequente migração em massa das células tumorais através da MEC. Essa migração pode ocorrer tanto de maneira isolada, quanto de maneira coordenada (Mcsherry, *et al*, 2007; Aumailley, 2013).

Em ambas as formas de migração, a primeira etapa consiste na extensão de prolongamentos citoplasmáticos, como filopódios finos e lamelipódios, após a ativação de genes específicos (Nobes & Hall, 1995). Também pode ocorrer pelo movimento mesenquimal dependente de proteases ou movimento amebóide independente de proteases (Aumailley, 2013).

As principais diferenças entre a migração isolada e a coordena, estão no fato de que na migração coordenada as células migram através dos vasos sanguíneos ou linfáticos, ligadas umas às outras através de junções intercelulares, formando êmbolos, diferente das células individuais, que se movem de forma independente, podendo alcançar espaços menores e distâncias maiores (Bell & Waizbard, 1986; Fenteany, *et al*, 2000).

Por fim, ocorre a estabilização da interação entre os prolongamentos celulares e a MEC, degradação enzimática da matriz adjacente e contração das redes de ligações, fazendo com que a célula consiga mover-se para frente (figura 9). Após todas essas etapas, as ligações são desfeitas e o processo se reinicia, permitindo assim a movimentação celular (Mcsherry, *et al*, 2007).

A interação da célula tumoral com o microambiente, tanto no local primário quanto no sítio metastático, é um fator crítico para o desenvolvimento de metástases distantes. No final da década de 1980, foi postulada a teoria “semente e solo”, na qual as células metastáticas (sementes) só seriam capazes de gerar um metástase quando encontrassem um microambiente favorável (solo) (Paget, 1989). Atualmente, discute-se a respeito do papel do microambiente

que irá receber essas células tumorais, como fator decisivo para a formação das metástases (Garner & Visser, 2020).

Nos tecidos ósseos, o sucesso da formação metastática depende da interação entre as células cancerosas e os componentes estromais do tecido, como osteoclastos e osteoblastos, influenciando o crescimento e a dormência dessas células (Scully, *et al*, 2012), enquanto nas metástases cerebrais, vias moleculares coordenam tanto as células cancerígenas quanto as células do estroma circundante, células imunes e matriz extracelular (Hosonaga, *et al*, 2020).

As células tumorais também secretam componentes que atuam nos tecidos distantes, de forma a preparar o nicho pré-metastático. O tumor primário pode induzir a expressão de MMPs e chuva de citocinas em células endoteliais pulmonares e macrófagos, antes mesmo do início da invasão deste órgão (Hiratsuka *et al.*, 2002; Garner & Visser, 2020).

No câncer de mama em específico, o tropismo para determinados tecidos desenvolvido pelas células tumorais para a formação de sítios metastáticos, parece ter uma íntima relação com a expressão de genes específicos e também com a presença de citocinas e quimiocinas que irão direcionar as células tumorais para tecidos que expressam seus receptores (Minn *et al*, 2005; Müller, *et al*, 2001; Garner & Visser, 2020).

2.5 Parênquima mamário de camundongos

A glândula mamária de camundongos é um órgão secretor complexo, composto por uma estrutura parenquimatosa que invade o coxim de tecido adiposo e conta com um infiltrado de células endoteliais vasculares, fibroblastos e células imunes e que, ao longo do desenvolvimento dos camundongos, passa por mudanças contínuas em sua estrutura e função (Macias & Hinck 2012; Richert *et al* 2000).

Os camundongos possuem cinco pares de mamas, que estão localizadas na camada adiposa subcutânea, onde três pares estão situados na região superior e dois pares na região inferior (Rillema, 1994; Richert, *et al*, 2000). As glândulas mamárias podem ser identificadas anatomicamente pela numeração de 1 a 5 ou por regiões (cervical, torácica, abdominal e inguinal), como demonstrado na Figura 10 (Honvo-Houéto & Truchet, 2015; Plante, *et al*, 2011).

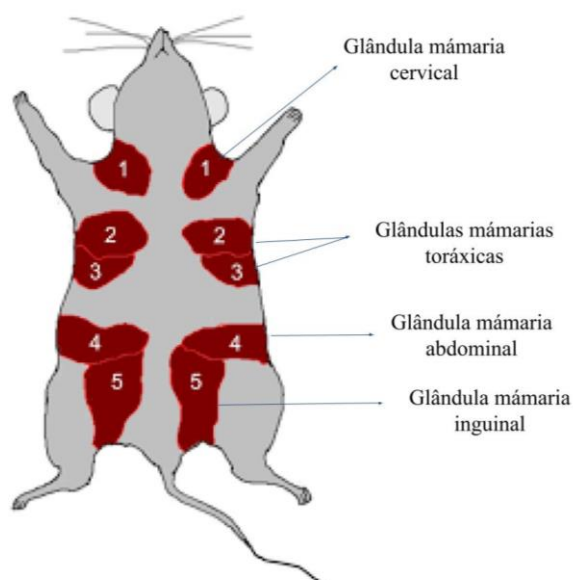


Figura 10:. Identificação das glândulas mamárias de camundongos. Por número e à direita por regiões. Fonte Lin et al., 2017. Adaptada.

O desenvolvimento mamário murino começa já na gestação, por volta do décimo dia embrionário (E10), nesse momento já são definidas as linhas de leite bilaterais. Por volta dos dias E11 – E12 células ectodérmicas se unem em cinco pares de placóides mamários, que, após um dia, formam montículos elevados que se afundam na derme, originando brotos cercados por um mesênquima mamário compactado e altamente especializado. Nos machos, por volta do E15, o primórdio mamário é destruído. Já nas fêmeas, começam a proliferar e invadir o coxim de tecido adiposo mais próximo, onde se ramificam e formam um lúmen, gerando uma árvore ductal oca no nascimento (Spina & Cowin, 2021). Após o nascimento, ocorre um amadurecimento rápido do coxim adiposo mamário e o epitélio cresce de maneira uniforme e ramificada até atingir a puberdade (Dawson & Visvader, 2021).

Antes da puberdade e no início da liberação do hormônio gonadal, o crescimento da glândula mamária corresponde ao crescimento geral do animal (Mcnally & Stein, 2017). Entre a 3ª e a 7ª semana de idade, são formados os botões terminais proliferativos (TEBs), através do estímulo do estrogênio, do hormônio do crescimento e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1. Os TEBs irão conduzir a morfogênese ramificada da glândula mamária através do coxim adiposo. Eles possuem alta taxa de proliferação celular e são formados por diversas camadas de células epiteliais envoltas por uma camada de células-tronco pluripotentes, as “*cap cells*”, que futuramente irão se diferenciar em células epiteliais ou mioepiteliais (Russo, 1996; Richert, *et al*, 2000; McNally & Stein, 2017).

Somente na 12ª semana os ductos mamários formam estruturas denominadas lóbulos, que podem ser identificadas como primário, secundário e terciário (Richert, et al, 2000). Os primários possuem poucos ductos e uma única camada de células epiteliais, em um estroma esparso de tecido conjuntivo frouxo. Os lóbulos secundários e terciários possuem um número aumentado de ductos, que se apresentam em um formato mais arredondado, formados por uma camada epitelial cuboide recoberta de uma camada mioepitelial, em um estroma mais denso e rico em fibroblastos (Richert, et al, 2000).

O epitélio mamário adulto sofre proliferação cíclica, onde se ramifica e regride em resposta ao ciclo ovariano, o que ocorre a cada 4-5 dias nos camundongos (Macias & Hinck, 2012). Em resposta ao aumento da progesterona, durante o metaestro e diestro, ocorre a proliferação dos ductos, gerando ramos terciários e assim que os níveis desse hormônio caem, tem-se o aumento de apoptose e regressão (Dawson & Visvader, 2021). As glândulas mamárias murinas, também passam por processos de alterações durante a gravidez, amamentação e involução, conforme Figura 11 (Mcnally & Stein, 2017).

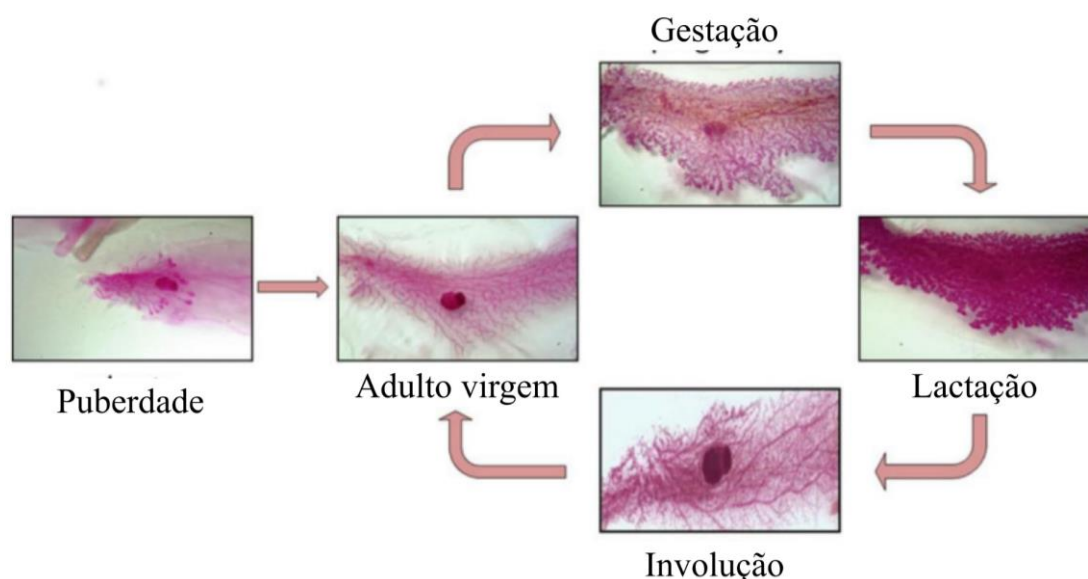


Figura 11: Montagens inteiras de glândula mamária de camundongo coradas com alúmen carmim evidenciando as alterações no desenvolvimento ductal mamário durante a puberdade, gravidez, lactação e involução. Fonte: McNally & Stein, 2017. Adaptada

As células epiteliais das glândulas mamárias são capazes de sintetizar e secretar produtos lácteos. Elas formam estruturas com lúmens e são envoltas externamente por uma camada basal de elementos contráteis, que são as células mioepiteliais (Richert, et al, 2000; Honvo-Houéto & Truchet, 2015).

2.6 INERVAÇÃO E CÂNCER

O sistema nervoso é subdividido em Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP). O SNC é composto pelo cérebro e pela medula espinhal, enquanto o SNP se refere a todas as fibras que não estão alocadas no SNC. O SNP é subdividido em Sistema Nervoso Somático e Autônomo. O sistema nervoso somático consiste em nervos que vão para a pele e músculos, além de estar envolvido nas atividades conscientes. Já o sistema nervoso autônomo atua nas atividades inconscientes e consiste em fibras nervosas que conectam o SNC a órgãos como coração, estômago e intestino (Thau et al, 2022).

O sistema nervoso regula os precursores de tecidos e tecidos ao longo da vida. Em paralelo, o sistema nervoso é um regulador crítico de inúmeras doenças, como por exemplo o câncer. Essa regulação do sistema nervoso no câncer se dá desde a oncogênese até o crescimento maligno e disseminação metastática. Assim como o sistema nervoso regula a progressão tumoral, o câncer também remodela e sequestra as estruturas e funções do sistema nervoso em seu benefício. Essas interações entre sistema nervoso e câncer, ocorrem tanto no microambiente tumoral (sítio primário), como sistemicamente. Fibras nervosas e células gliais comunicam-se de forma direta com células cancerosas através de fatores parácrinos, e em alguns tipos de tumores através de sinapse entre neurônios e células tumorais. Além dessa comunicação direta, podem ocorrer comunicações através de sinais circulantes através de influências de tráfego e nas funções das células imunológicas. É essa conversa cruzada da tríade - sistema nervoso, sistema imunológico e câncer - que regula a inflamação pró-tumoral e a imunidade anticâncer, conforme demonstrado na figura 12 (Mancusi & Monje, 2023).

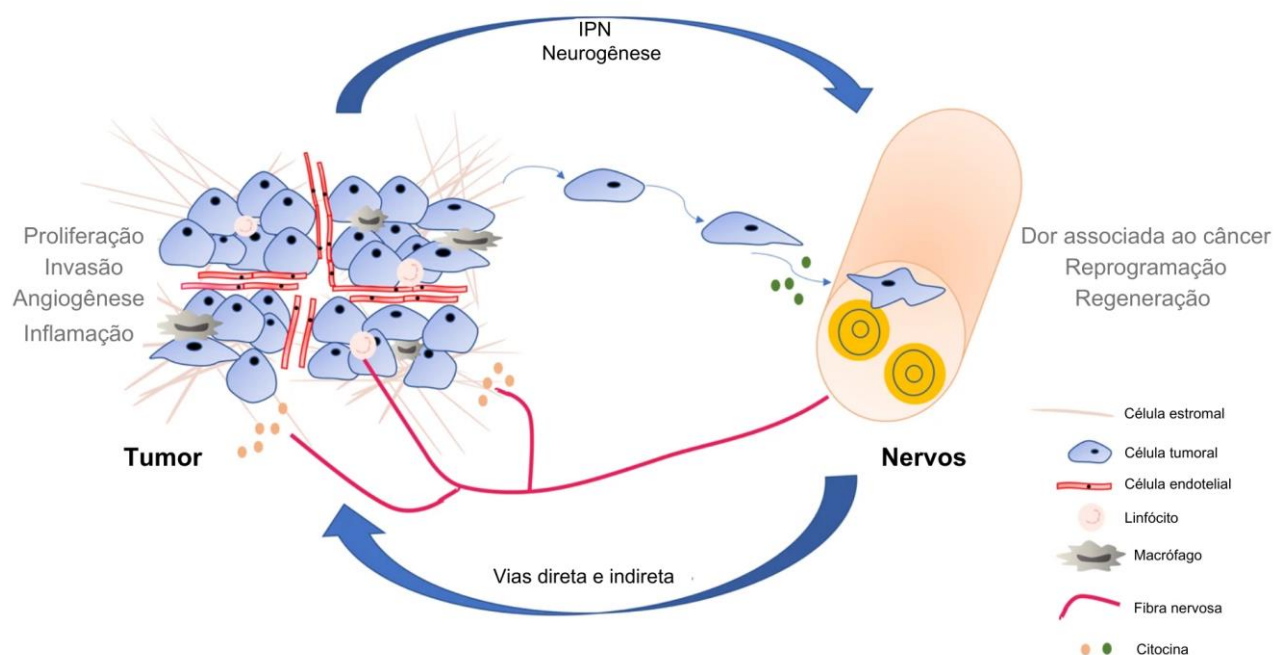


Figura 12: Crosstalk nervo-tumor. Os nervos podem secretar moléculas neuroativas que atuam nas células tumorais, linfócitos e macrófagos para promover a proliferação, invasão, angiogênese e inflamação do tumor. Por sua vez, as células tumorais migram para os nervos danificando-os para induzir a dor associada ao câncer. Além disso, as células tumorais secretam citocinas, que impulsionam a reprogramação e regeneração nervosa. Fonte: Wang et al, 2021. Adaptada.

Na literatura é bem descrito o aumento da formação de vasos sanguíneos durante a progressão tumoral, conforme figura 12. À medida que há progressão do tumor, há também encorpamento das fibras nervosas (Zahalka & Frenette, 2020). Ao passo que a densidade nervosa aumenta, mais agressiva se torna a doença e menos favoráveis são os diagnósticos para o paciente, como ocorre por exemplo em tumores de próstata (Ayala, et al, 2008; Magnon et al, 2013), cólon e reto (Albo et al, 2011), cabeça e pescoço (Raju et al, 2017), mama (Huang et al, 2014), pâncreas (Partecke et al, 2016), estômago (Zhao et al, 2014) e pulmão (Shao et al, 2016).

Em tumores de mama, a presença de fibras nervosas está intimamente relacionado com a diferenciação, formação de metástase linfonodais, estadiamento clínico elevado e subtipo triplo negativo (Huang et al, 2014). Da mesma forma, em tumores pancreáticos, a densidade das fibras nervosas também foi correlacionada com o tamanho do tumor, status da margem, metástases linfonodais (Chatterjee et al, 2012; Tan et al, 2020).

A invasão das fibras nervosas nos tumores, tanto no interior como ao redor dos nervos na invasão perineural (IPN), pode ser observada muito antes da invasão linfática e vascular. É

considerado invasão perineural quando o tumor envolve pelo menos 33% da circunferência do nervo ou há presença de células tumorais em qualquer uma das três camadas da bainha nervosa (Liebig et al, 2009). Wang e colaboradores em 2021, demonstraram o processo de IPN, conforme disposto na figura 12.

A IPN costuma ser mais comum em cânceres mais agressivos, além de ser incidente em até 80% dos casos de câncer de cabeça e pescoço, 75% em cânceres de próstata, 98% em câncer de pâncreas, 33% de cânceres colorretais e 75% em cânceres de vias biliares (Wang et al, 2021).

A IPN é considerada uma rota potencial para a disseminação metastática de células cancerígenas, da mesma forma que as vias vasculares e linfáticas (Amit et al, 2016). Células tumorais podem invadir o tecido neuronal antes do início da tumorigênese. Em tumores pancreáticos, por exemplo, as células derivadas de acinares do pâncreas migram ao longo dos neurônios sensoriais para a medula espinhal, o que evidencia que a IPN é uma importante rota de disseminação metastática (Saloman et al, 2016).

Autores como; Abiatari e colaboradores, 2009, De Oliveira e colaboradores, 2012, Marchesi e colaboradores, 2012, e Li e colaboradores em 2014, hipotetizaram que as células tumorais seguem ao longo ou ao redor do nervo, após se infiltrar no espaço perineural durante as lesões nervosas, o que por sua vez promove regeneração neural. Essas lesões neurais causadas pela invasão de células cancerosas resultam em uma chuva de citocinas inflamatórias, formando um microambiente celular e bioquímico único ao redor do nervo, conforme demonstrado na figura 12.

Inúmeros estudos sugerem que a denervação apresenta efeitos inibitórios tanto no início como na progressão de tumores. Consequentemente, hipotetizou-se que o contrário teria resultados opostos, ou seja, o aumento da sinalização nervosa promoveria progressão tumoral (Zahalka & Frenette, 2020).

Kamiya e colaboradores, em 2019, utilizaram um modelo de tumor de mama ortotópico em camundongos e engenharia genética para induzir a expressão de canais de sódio de ação prolongada em nervos adrenérgicos intratumorais. A ação prolongada sob esses canais aumentou a atividade nervosa adrenérgica e os níveis intratumorais de noradrenalina, o que resultou em aumento do tamanho do tumor.

Um fator bastante importante na progressão do câncer, é o estresse crônico, normalmente relacionado a piores resultados clínicos (Lillberg et al, 2003, Chida et al, 2008). Le e colaboradores, em 2016, utilizaram um modelo transgênico de câncer de mama e realizaram administração prolongada do agonista β -adrenérgico não seletivo isoprenalina, reproduzindo dessa forma, os efeitos do estresse. Essa administração prolongada do agonista β -

adrenérgico, causou o aumento de metástases linfonodais e densidade vascular linfática, mas não afetou o crescimento do tumor primário. Por outro lado, o mesmo estudo demonstrou que a inibição adrenérgica com β -bloqueador não seletivo propranolol inibiu metástases linfonodais e linfangiogênese.

Já Hassan e colaboradores em 2013, utilizaram modelos de camundongos transgênicos de câncer de próstata, nos quais realizaram inibição do receptor β 2-adrenérgico, deleção embrionária do gene que codifica o receptor β 2-adrenérgico, e do gene que codifica receptor β 3-adrenérgico, resultando na inibição da progressão do tumor. Esses autores sugeriram que os receptores β -adrenérgicos medeiam efeitos protumorigênicos no microambiente tumoral.

Outros autores também demonstraram que o aumento da atividade parassimpática apresenta efeito pró tumorigênico. Os nervos parassimpáticos, células quimiosensoriais especializadas, assim como as células epiteliais do tubo gastrointestinal, liberam acetilcolina, que sinaliza através dos receptores muscarínicos e nicotínicos nas células alvo. Em modelos de camundongos transgênicos de câncer gástrico, ao depletar o receptor muscarínico de acetilcolina 3 (M3R) nas células epiteliais gástricas, retarda o crescimento e a progressão tumoral (Hayakawa et al, 2017). Em modelos de xenoenxerto transgênico e ortotópico de câncer de próstata a estimulação do receptor muscarínico de acetilcolina 1 (M1R) com o agonista de carbacol estimulou a formação de metástase linfonodais, enquanto a inibição farmacológica ou a depleção genética do mesmo receptor preveniu a formação de sítios metastáticos (Magnon et al, 2013). Já em modelos de câncer de pâncreas, a transecção do nervo vago acelera a progressão tumoral (Partecke et al, 2017).

Estudos em modelos *in vivo* mostraram que os tumores de mama têm maior expressão de PGP9.5 e CGRP, ambos marcadores expressos nas fibras positivas de Nav 1.8 (Austin et al, 2017; Gautron et al, 2011). Esse número aumentado de fibras nervosas também pode estar relacionado a uma alta densidade de microvasos, bem como a uma alta expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), fator importante para angiogênese tumoral, que pode ser expresso em terminais nervosos sensoriais (Austin et al, 2017; Q. Zhao et al, 2014).

Devido a glândula mamária ser um derivado de pele, demonstra ter um padrão de inervação semelhante ao da pele, recebendo fibras sensoriais e simpáticas e poucas evidências de fibras colinérgicas (Hebb et al, 1970, Gerendai et al, 200, Köves et al, 2012). Stanke e colaboradores em 2005, sugeriram que possa ocorrer diferenciação colinérgica dos nervos adrenérgicos, assim como foi observado em glândulas sudoríparas da pele.

No trabalho de Kamiya e colaboradores, em 2019, foi identificado que a recorrência das pacientes com câncer de mama estava intimamente ligada com a densidade do nervo

adrenérgico tumoral e inversamente correlacionada com a densidade do nervo colinérgico em amostras de tumores.

Szpunar e colaboradores em 2016, discutiram sobre o uso de simpatectomia química de longo prazo utilizando 6OHDA (dopamina mimética 6-hidroxidopamina) em modelos camundongos transgênicos e ortotópicos de câncer de mama. Os autores relatam diminuição dos níveis de noradrenalina intratumoral e consequente diminuição do tamanho do tumor. Além disso, os autores relataram resultados semelhantes em modelos de melanoma e câncer de próstata. Dados ainda não publicados pelo nosso grupo, utilizando depleção com resiniferatoxin (RTX) corroboram com esses achados.

Em contrapartida, Erin e colaboradores em 2008 relataram um aumento de metástases pulmonares, hepáticas e renais em um modelo de câncer murino após a vagotomia unilateral. Neste estudo, o grupo relata que não houve diminuição ou interferência no crescimento do tumor primário. O grupo de Erin, em 2022, publicou um novo estudo relacionando a estimulação de neurônios sensoriais através dos receptores TRPV1 utilizando um análogo da capsaicina (Olvanil). Nesse estudo, o grupo relata que não houve diminuição do tumor primário, contudo, ocorreu diminuição da disseminação metastática e aumento do infiltrado de células imunes positivas para CD3+CD8+ e CD4+CD8+ nos tumores primários.

No estudo publicado pelo nosso grupo em 2020 (Prazeres et al), relatamos que os camundongos que tiveram os neurônios sensoriais depletados em um modelo de câncer melanoma, apresentaram um aumento do tamanho do tumor quando comparado aos animais que não tiveram os neurônios sensoriais depletados. Da mesma forma, em um outro estudo do nosso grupo publicado em 2021, (Costa et al), relatamos resultados semelhantes com a ativação e inibição de neurônios sensoriais através de técnicas de quimiogenética, nos tumores do tipo melanoma. Em contrapartida Balood e colaboradores em 2022, demonstraram em um modelo de camundongos de câncer melanoma, que a ablação genética de TRPV1 (receptor de potencial transiente vanilóide 1), o silenciamento farmacológico de nociceptores e o antagonismo do receptor de CGRP reduz a exaustão de leucócitos infiltrantes no tumor e diminuíram o crescimento de tumores primários e consequentemente aumentando as taxas de sobrevivência dos camundongos.

Como citado acima, a denervação, em alguns tumores, aparentemente é mais benéfica para o paciente e que a estimulação nervosa teria efeitos opostos sobre o tumor. Consequentemente, se há estimulação, há mais atividade nervosa e mais liberação de neuropeptídeos. Porém ainda não são muito claros os efeitos de cada neuropeptídeo no microambiente tumoral.

7 CANAIS DE ÍONS DEPENDENTES DE VOLTAGEM (VGICs)

Os canais controlados por íons dependentes de voltagem (VGICs) são complexos proteicos de sub unidades múltiplas que permitem a passagem de íons inorgânicos que são selecionados pelas membranas celulares. A abertura e o fechamento desses canais se dá em resposta à mudança na tensão transmembrana. Essas mudanças transmembranas são fundamentais na sinalização elétrica, no caso das células excitáveis (Rasband & Trimmer., 2009).

O grupo de VGICs, é composto pelos canais de cálcio controlado por voltagem (CaV), canais de potássio (KV) e sódio controlado por voltagem (NaV), esses canais desempenham um papel fundamental na regulação da excitabilidade neuronal e para a atividade espontânea evocada por estímulos em neurônios primários (Sangameswaran et al, 1996; Fein, 2012).

2.7.1 Canais Dependentes de Sódio Voltagem (VGSCs)

Os canais de sódio foram os primeiros membros da superfamília dos canais iônicos a serem descobertos (Hu & Catterall, 2003). Os canais de sódio dependentes de voltagem (VGSCs), são compostos por uma subunidade α formadora de poros e até duas subunidades β associadas, sendo críticos para o início do potencial de ação (PA) em tecidos excitáveis (Kruger & Isom, 2016). Os canais dependentes de sódio voltagem VGSCs, são uma família de proteínas transmembranares que desempenham um papel de destaque na fisiologia celular, particularmente na geração e propagação de impulsos elétricos em células excitáveis. Estes canais são notáveis pela sua rápida ativação em resposta a variações no potencial elétrico da membrana, o que resulta na permeação seletiva de íons sódio (Na^+) para o interior da célula (Catterall & Yu, 2012).

A família de canais VGSCs é composta por várias subunidades diferentes, sendo as principais conhecidas como subunidades alfa. Cada uma dessas subunidades é composta por quatro domínios transmembranares (S1-S4), que são responsáveis pela detecção e resposta às mudanças de voltagem na membrana. Além disso, essas subunidades contêm um poro central formado por regiões S5 e S6, que permite a passagem seletiva de íons de sódio quando o canal está aberto (Mantegazza & Catterall, 2012; Hernandez & Richards, 2023).

As diferentes subunidades α definem os subtipos distintos de canais de Nav e contêm receptores para drogas e toxinas que atuam nos canais de Nav. As subunidades α são grandes polipeptídeos de cadeia única compostos por aproximadamente 2.000 resíduos de aminoácidos

organizados em quatro domínios homólogos, designados DI a DIV, que formam uma estrutura pseudotetramérica (Ruiz & Kraus, 2015).

A estrutura molecular dos canais VGSCs é altamente conservada em todas as subunidades alfa e compartilha semelhanças com outras famílias de canais iônicos dependentes de voltagem, como os canais dependentes de cálcio (VGCCs). Essa estrutura é essencial para a função dos canais VGSCs, uma vez que os domínios transmembranares sensoriais detectam as mudanças de voltagem, permitindo que o canal se abra ou se feche de acordo com o potencial elétrico da membrana (Mantegazza & Catterall, 2012).

Os canais dependentes de sódio voltagem são críticos para a rápida despolarização das membranas celulares durante a geração de potenciais de ação, que são fundamentais para a transmissão de sinais elétricos em células nervosas e musculares. A família dos canais de sódio compreende os canais Nav 1.1 a 1.9 (Kruger & Isom, 2016). Na tabela 1 estão dispostos os canais Nav de 1 a 9, seus genes de expressão e em quais tecidos são expressos.

Canal	Gene de expressão	Distribuição tecidual
Nav 1.1	SCN1A	SNC, SNP, coração
Nav 1.2	SCN2A	SNC, SNP
Nav 1.3	SCN3A	SNC, SNP, coração
Nav 1.4	SCN4A	Músculo esquelético, coração
Nav 1.5	SCN5A	Músculo esquelético, coração, SNC
Nav 1.6	SCN8A	SNC, SNP, coração
Nav 1.7	SCN9A	SNP
Nav 1.8	SCN10A	SNP
Nav 1.9	SCN11A	SNP

Tabela 1: Canais dependentes de Na⁺, de genes de expressão, localização de expressão tecidual. Fonte: Kruger & Isom, 2016. Adaptado.

Os canais Nav 1.1 são altamente expressos no SNC e desempenham um importante papel na geração de potenciais de ação em neurônios corticais, já o canal Nav 1.2 além de gerar potenciais de ação em neurônios corticais também está relacionado a geração de potenciais no

hipocampo. Já os canais Nav 1.4 e 1.5 são expressos em tecidos musculares, Nav 1.4 está relacionado às fibras musculares esqueléticas e está envolvido nas contrações voluntárias desses músculos, enquanto Nav 1.5 é expresso em fibras cardíacas e é fundamental para a geração de potenciais de ação no coração (Kruger & Isom, 2016).

Os canais Nav 1.7 e 1.8 são parecidos. Ambos são expressos em neurônios sensoriais periféricos e estão envolvidos na transmissão de sinais dolorosos. Já os canais Nav 1.9 também são expressos em neurônios sensoriais periféricos, estão envolvidos na condução da dor e na hiperalgesia inflamatória (Kruger & Isom, 2016).

2.7.1.1 Canais Nav 1.8

Canais Nav 1.8, também descritos na literatura com os nomes: SNS, PN3 ou ScN10A (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 10), são amplamente expressos em neurônios sensoriais periféricos, desempenham um papel crucial na transdução de sinais dolorosos e na condução de impulsos nociceptivos. Possuem um limiar de ativação alto, cerca de -30mV. Por possuírem propriedades biofísicas únicas, a ativação em voltagem mais despolarizada e inativação mais lenta como corrente persistente, permite hiperexcitabilidade dos neurônios do DRG, sendo assim, são particularmente importantes na geração e condução de potenciais de ação em neurônios sensoriais periféricos relacionados à dor (Akopian *et al.* 1996; Sangameswaran *et al.* 1996; Oaklander & Belzberg, 1997; Goldin *et al.* 2000; Huang, *et al.*, 2022).

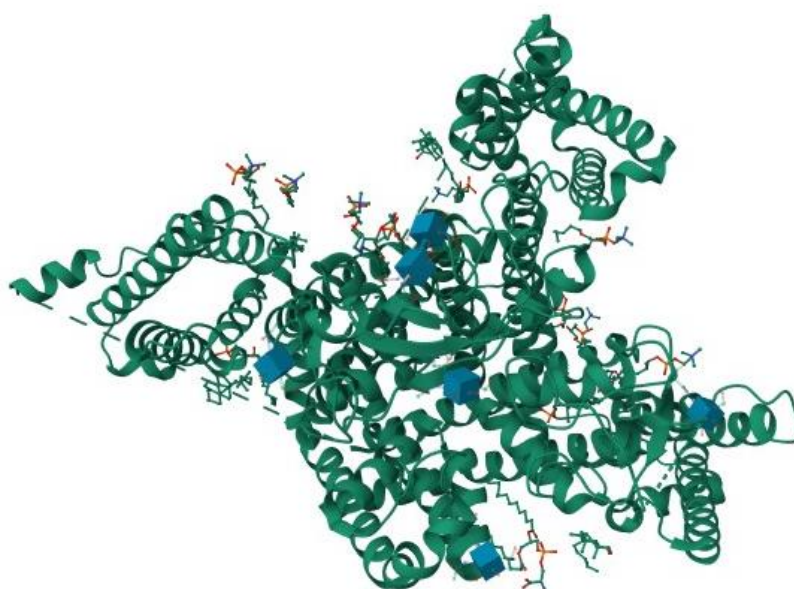


Figura 13: Estrutura molecular do canal Nav 1.8. Fonte: Huang, *et al.*, 2022.

A excitabilidade neuronal envolve expressões coordenadas de diferentes canais iônicos dependentes de voltagem. O canal Nav 1.8 é um canal caracterizado pela expressão de duas subunidades α . A expressão de Nav 1.8 nos DRGs (gânglios da raiz dorsal) aumentam no decorrer da idade, a começar no dia embrionário (E15), atingindo níveis adultos no sétimo dia pós natal. A distribuição de Nav 1.8 é restrita principalmente às subpopulações de neurônios sensoriais primários em desenvolvimento e DRGs adultos que darão origem a fibras nervosas do tipo C, não mielinizadas (Benn et al., 2001).

Alguns autores apoiam que a localização preferencial de canais Nav1.8 se dá em neurônios aferentes nociceptivos de pequeno e médio diâmetro, contudo, Ramachandra e colaboradores, em 2013, publicaram um estudo evidenciando que o canal Nav 1.8 é o canal Nav dominante expresso nos somas de neurônios aferentes musculares pequenos, médios e de grande diâmetro. Além disso, esses mesmos autores demonstraram que a expressão de Nav1.8 não está correlacionada com o diâmetro do neurônio aferente.

Assim como outros tipos de fibras nervosas têm sido associadas com a progressão tumoral (item 2.6), os neurônios sensoriais não têm sido diferentes, de forma especial os canais Nav1.8 foram descritos. Suy e colaboradores em 2019, usando um anticorpo pan-Nav, que reconhece o ligante DIII-DIV conservado de todos os isotipos de Nav, forneceram evidências de que os Navs eram altamente expressos em tecidos de câncer de próstata humano. Além disso, demonstraram que a imunorreatividade dos Navs é maior em tecidos de câncer de próstata humano em comparação com a próstata humana normal.

A expressão de Nav em tumores como de próstata, pulmão de pequenas células, e de mama é comumente associada a pior prognóstico e maior invasividade (Smith et al, 1998; Diss et al, 2001; Abdul M & Hoosein N, 2002). Nos casos de tumores de mama, ainda foi observado que a expressão de Nav é maior quando o tumor possui alta capacidade metastática (Rhana et al, 2017). No que diz respeito à relação da expressão de canais Nav1.8 em tumores de mama, ainda não é muito clara na literatura.

2.8 DREADDS

Receptores de Design Ativados Exclusivamente por Drogas de Design (DREADDs), são o resultado de uma evolução de um sistema de mutagênese de leveduras onde os receptores muscarínicos acoplados à proteína G mutantes foram isolados. Esses receptores perderam a capacidade de responder à acetilcolina, seu ligante natural, mas ganharam afinidade por uma

droga específica. Esses receptores acoplados à proteína G podem controlar vias de sinalização ligados a essa proteína, como por exemplo as vias Gq, Gs e Gi (Zhu *et al*, 2016).

Esse é um recurso quimiogenético amplamente utilizado para controle das vias de sinalização acopladas à proteína G, incluindo estudos *in vivo*, como por exemplo, camundongos. Existem vários DREADDs disponíveis, contudo, os mais comuns e mais utilizados em pesquisas são as cepas hM3Dq (ativação) e hM4Di (inibição) de camundongos que permitem a expressão restrita mediada por Cre recombinase desses DREADDs seletivos de via. Além da dependência por Cre recombinase, como citado anteriormente, esse modelo é dependente de uma droga para ser ativado, sendo uma das mais comuns o composto inerte N-Óxido de Clozapina (CNO) (Armbruster, *et al*, 2007; Alexander, *et al*, 2009).

Tanto o hM3Dq quanto o hM4Di, estão sob efeito de um promotor, que é separado do DREADD por um sinal *Stop* flanqueado por um sítio loxP. O cruzamento com qualquer linhagem de driver Cre removerá o sinal *Stop* apenas na célula específico do driver Cre usado, e esse DREADD será expresso especificamente na célula e pode ser então ativado pelo seu ligante específico (droga específica) (Sauer, 1998; Zhu *et al*, 2016).

2.8.1 Gq-DREADDs

Quando os DREADDs originais foram criados, três DREADDs acoplados a Gq foram desenvolvidos, hM1Dq, hM3Dq e hM5Dq, cada um baseado em um receptor muscarínico humano diferente. Para realizar o aumento da atividade neuronal e fazer ativação da sinalização Gq farmacologicamente utiliza-se baixas concentrações nM de clozapina N óxido (CNO), melhor descrito no item 2.10. Essa droga mobiliza o cálcio intracelular, promovendo aumento de atividade. Todos os três DREADDs Gq podem ser usados como DREADDs excitatórios, porém o mais usado é o hM3Dq (Roth, *et al*, 1994; Armbruster, *et al*, 2007; Alexander, *et al*, 2009).

Na literatura, a utilização de hM3Dq é citada em vários contextos, incluindo células HEK transitoriamente transfectadas (Armbruster, *et al*, 2007), fibroblastos embrionários (*in vitro*) (Armbruster, *et al*, 2007; Conklin, *et al*, 2008; Guettier, *et al*, 2009), neurônios (*in vivo* e *in vitro*) (Alexander, *et al*, 2009), astrócitos (*in vivo*) (Agulhon, *et al*, 2013), hepatócitos (*in vivo* e *in vitro*) (Li, *et al*, 2013), e células β pancreáticas (*in vivo* e *in vitro*) (Guettier, *et al*, 2009; Jain, *et al*, 2013).

Dois estudos independentes publicados pelo grupo de Alvarez-Curto em 2011, relatam que o padrão de sinalização induzido pela ferramenta quimiogenética CNO-hM3Dq imita

fielmente a dos receptores muscarínicos M3 nativos ativados pela acetilcolina. Autores como: Alexander e colaboradores em 2009; Guettier e colaboradores em 2009 Li e colaboradores em 2013; e Jain e colaboradores em 2013, ressaltam que a superexpressão de hM3Dq, não aumenta sua atividade basal, e sendo assim, mesmo quando o hM3Dq é massivamente superexpresso ao longo da vida de um camundongo, nenhum efeito adverso aparente foi detectado.

A atividade alcançada usando hM3Dq e induzida por CNO são específicas para cada célula. No caso dos neurônios, a ativação leva a uma despolarização e consequente aumento da excitabilidade. Alguns autores, como Alexander e colaboradores em 2009, Krashes em 2013 e Atasoy, Betley, Su e Sternson em 2012, descrevem essa excitabilidade como disparos do tipo rajada, e portanto, hM3Dq é o DREADD mais usado para aumentar disparos neuronais.

O hM3Dq, está supostamente sujeito aos mesmos tipos de regulação canônica que outros receptores acoplados à proteína G, como por exemplo, fosforilação, dessensibilização, internalização e regulação negativa. A ativação prolongada com CNO pode levar a uma resposta atenuada devido à dessensibilização ou a uma regulação negativa do hM3Dq (URBAN e ROTH 2015). Embora autores como Alexander e colaboradores em 2009, Krashes e colaboradores em 2011 e em 2013 e Jain e colaboradores em 2013, relataram atividade sustentada do hM3Dq, esses autores relacionam essa sustentação ao grande grau de reserva do receptor hM3Dq.

2.9 CLOZAPINA N ÓXIDO - CNO

O N-Óxido de Clozapina (CNO) é um benzodiazepínico substituído por piperazina oxidase e um metabólito do antipsicótico Clozapina, utilizado como um protótipo atuador químico para vários DREADDs, como: os excitatórios Gq, inibitórios Gi e acoplados a proteína Gs e β -arrestina (Gomes, *et al*, 2017).

Estudos como o de Guettier e colaboradores publicado em 2009, demonstram que 1 mg/kg i.p (intraperitoneal) de CNO em camundongos é suficiente para os atingir níveis plasmáticos de CNO em 15 minutos e uma diminuição drástica após 2 horas.

In vivo, o CNO se converte em clozapina e ativa receptores DREADDs. Essa redução enzimática e não enzimática do CNO para clozapina foi demonstrada em humanos, ratos, macacos, porquinhos da índia e camundongos (Gomes, *et al*, 2017).

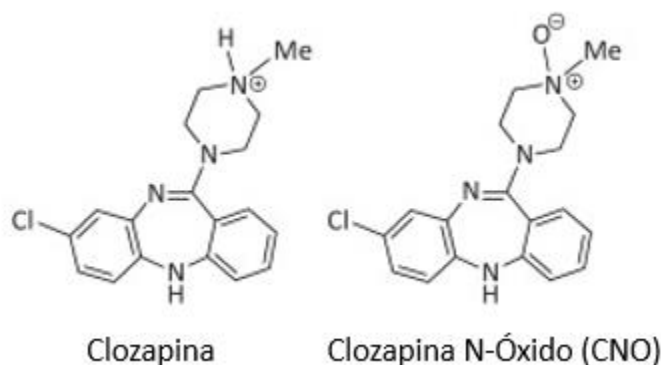


Figura 14: Comparação entre as moléculas de clozapina e Clozapina N- Óxido. Fonte: (Wess, et al, 2013). Adaptada.

Manvich e colaboradores em 2018, apresentaram um estudo demonstrando essa redução enzimática e não enzimática, em que o CNO é metabolizado reversamente para clozapina tanto em ratos como em camundongos, e que as doses comumente usadas para ativar os DREADDs são capazes de produzir estímulos interoceptivos semelhantes aos estímulos produzidos pela clozapina. Esses mesmos autores também evidenciaram que tanto em ratos como em camundongos o CNO é rapidamente convertido em clozapina, contudo essa clozapina convertida se comporta diferente entre as espécies. Em ratos a clozapina convertida é lentamente metabolizada em CNO, podendo ser convertida novamente em clozapina e por fim em NDMC, o metabólito ativo da clozapina (N-desmetilclozapina). Já em camundongos a conversão da clozapina em NDMC é muito rápida e não há relatos de nova conversão em CNO, ou seja, a retroconversão do CNO é espécie-dependente.

Além da retroconversão do CNO em clozapina, um dos pontos de maior questionamento em relação ao uso CNO quanto agonista DREADD é em relação a sua capacidade de atravessar a barreira hemato encefálica. Autores como Gomes e colabores em 2017, sugeriram que o CNO administrado in vivo de forma sistêmica, não consegue atravessar a barreira hematoencefálica com facilidade, isso porque as prováveis concentrações encontradas em amostras de cérebro estivessem nos vasos sanguíneos ou no líquido cefalorraquidiano e não no tecido cerebral propriamente dito.

Em contrapartida Jendryka e colegas publicaram um estudo em 2019, utilizando CNO sistemicamente em concentrações de 3,5 mg/kg, e demonstraram que o CNO possui capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e que as concentrações presentes no cérebro são suficientes para ativar os DREADDs.

O uso das ferramentas DREADDs para estudos voltados para neurociência em específico sistema nervoso central foi um verdadeiro pioneirismo na ciência. Esse é um dos

motivos pelos quais a maioria dos estudos publicados usando DREADDs e estimulando-os com CNO são voltados para SNC, porém, tem-se na literatura vários estudos utilizando DREADDs para ativar outros tipos de células, como células β pancreáticas como descrito por Guettier e colaboradores em 2009; Azua e colaboradores em 2010; Jain e colaboradores em 2013; Nakajima e colaboradores em 2013; Papazoglou e colaboradores em 2022, entre outros.

Além de células β pancreáticas, têm-se inúmeros registros do uso de DREADDs estimulados com CNO em células gliais: Agulhon e colaboradores em 2013 utilizaram desse sistema para realizar modulação do sistema nervoso autônomo (SNA); McClain, Fried e Gulbransen em 2015 observaram que a modulação quimiogênica de células gliais são capazes de induzir a motilidade intestinal em camundongos; já Tedoldi, Argent e Montgomery em 2021 descrevem em seu estudo como a modulação de células gliais podem interferir na fisiologia e fisiopatologia cardíaca.

Já para a modulação de fibras nervosas sensoriais, em 2013 Vrontou e colaboradores utilizaram CNO para estimular DREADDs ligados a nervos sensoriais; Saloman e colaboradores em 2023, utilizando camundongos DREDDs de inibição (hM4Di) e estimulando-os com CNO, observaram que a dor e neuropeptídeos secretados por nervos sensoriais são fatores cruciais para o aumento e progressão do tumor. Um outro estudo utilizando DREADDs em fibras nervosas sensoriais publicado por Costa e seus colaboradores em 2021, demonstraram que o CNO foi capaz de estimular fibras nervosas sensoriais do tipo c em camundongos.

2.10 CÉLULAS E0771

Camundongos com fundo C57BL/6 foram a primeira linhagem endogâmica a ter o genoma sequenciado, sendo uma das linhagens mais utilizadas experimentalmente. As células E0771 estão entre as poucas linhagens de câncer de mama resultantes desse background (Le Naour, *et al*, 2020).

As células E0771, também descritas com os nomes E O'771 e EO 771, foram isoladas em 1940 de um câncer de mama espontâneo, e vêm sendo amplamente utilizadas desde então. Suas características estão bem descritas, mas com informações contraditórias (Le Naour, *et al*, 2020).

Autores como Le Naour e colaboradores em 2020 demonstraram que essas células apresentam um fenótipo semelhante ao câncer mamário luminal B, além disso manifestaram sensibilidade a tratamentos anti-estrogênio e o tamoxifeno não alterou a sensibilidade nem o fenótipo das células.

Autores como Johnstone CN, Smith YE, Cao Y e colaboradores em 2015, Liu J, Blake SJ e colaboradores em 2016, Bernard e colaboradores em 2017 e Contreras-Zárte e colaboradores em 2019, classificam células E0771 como triplo negativo. Essa caracterização é uma das mais aceitas, dado alguns autores como Gu, e colaboradores em 2009 onde demonstraram a expressão da proteína por western blotting, e Hiraga; Ninomiya, em 2019, apontaram que o gene que codifica RE α é transcrito nessas células, porém com uma presença mais fraca e em nível não nuclear, comparado a outras células já descritas como RE α +

Poucos autores investigaram receptores de progesterona, ER β e ErbB2 em células E0771. Johnstone e colaboradores em 2015 e Hiraga; Ninomiya, em 2019, não encontraram nenhuma transcrição gênica para ou expressão de receptores de progesterona. Já para o ErbB2, Johnstone e colaboradores em 2015, descrevem não terem encontrado nenhuma expressão em tumores primários nas avaliações por imuno-histoquímica, enquanto Hiraga; Ninomiya, em 2019 e Zou e colaboradores em 2013, encontraram respectivamente transcrição de ErbB2 e expressão de proteína apontada por western blotting.

Células E0771 também foram caracterizadas a partir de outros marcadores, como o P53, que, quando presente em tumores, estão associadas aos subtipos basais de câncer de mama. Johnstone e colaboradores em 2015, demonstraram utilizando células cultivadas, por imuno-histoquímica uma coloração uniforme para p53 em células E0771 enquanto em 4T1, uma linhagem triplo negativo bem estabelecida, essa coloração foi negativa. Esse mesmo resultado foi confirmado utilizando western blotting.

Moléculas imunomoduladoras como PD1 e PDL1 também foram testadas para células E0771, segundo Le Naour; Rossary; Vasson em 2020, PD1 e seu ligante PDL1 mostraram atividade antitumoral parcial, em combinação com outras terapias como quimioterapia e imunoterapia adicional, aumentou a eficácia terapêutica resultando em maior infiltração de linfócitos CD8+ e produção de citocinas pró inflamatórias como IL-2 e TNF. Já Gray e colaboradores em 2016 demonstraram que o tratamento por um anticorpo direcionado à fosfatidilserina inibe o crescimento do tumor e aumenta significativamente a atividade antitumoral mediada por PD1.

E0771 em camundongos tem vantagem de ter uma absorção tumoral de quase 100% permitindo a interação celular em um microambiente completo, principalmente quando o implante é ortotópico (Hoover, et al, 2012; Nachat-Kappes, et al, 2012). Por ser um modelo imunocompetente é ideal para avaliar o papel imune frente ao desenvolvimento do tumor. Além disso, apresenta bastante semelhança com o câncer humano, além de disseminação para múltiplos sítios como pulmão, fígado, ossos e cérebro (Le Naour, *et al*, 2020).

Autores como Karkeni; Morin; Bou Tayeh; Goubard e colaboradores em 2019 e Huang; Ma; Zhang; Ye em 2015, descrevem que em tumores E0771, ocorre um aumento de células CD4⁺/CD8⁺. Em estágios iniciais é possível encontrar maiores quantidades de CD8⁺, o que descreve um perfil mais antitumoral, enquanto em estágios mais tardios há uma maior quantidade de CD4⁺ incluindo Th1, Treg e Th17.

Nesses modelos ortotópicos, essas células também interagem com outras células do microambiente, como os adipócitos, que através das adipocinas apresentam atividade pró-tumoral, potencializando o crescimento do tumor, vascularização e migração de células E0771 (Xiong, et al., 2017). Além disso, a comunicação com fibroblastos aumenta a viabilidade das células E0771, o que induz a resistência terapêutica, além de promover o crescimento do tumor (Fourie; Davis; Kriel; Engelbrecht, 2019), embora esse esteja bastante relacionado com as características do animal como, por exemplo, o seu peso corporal (Bassukas; Maurer-Schultze, 1992).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer é considerado um problema de saúde pública a nível mundial e se encontra entre as quatro primeiras posições como responsável por mortes consideradas prematuras (BRASIL, 2020) e o câncer que mais mata em todo o mundo. Segundo a OMS, na última década o número total de pessoas diagnosticadas com câncer passou de 10 milhões em 2000 para 19,3 milhões em 2020, sendo as projeções para 2040, 50% maiores que em 2020. Além disso, o número de mortes aumentou de 6,2 milhões em 2000 para 10 milhões em 2020. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2023) prevê para o triênio 2023-2025 a ocorrência de mais de 74 mil novos casos de câncer de mama por ano.

Estudos recentes demonstraram que um dos motivos da complexidade do câncer de mama se dá devido ao seu microambiente complexo composto não só das células cancerígenas, mas também por uma variedade de células como células imunes, do estroma, vasos sanguíneos e linfáticos, pericitos, fibroblastos, entre outros (Soyasal et al, 2015; Petitprez et al, 2018). Além desses elementos, ainda há estudos relatando a presença de fibras nervosas no microambiente tumoral, inclusive nos tumores de mama (Pundavela et al, 2015; Perrot et al, 2020; Barr et al, 2021; Han et al, 2021).

A mama é inervada tanto por fibras sensitivas, principalmente na pele e região dos mamilos, bem como por fibras simpáticas, nos vasos sanguíneos e ductos (Q. Zhao et al., 2014; Miao et al, 2010; Pundavela et al, 2015; Sarhadi et al, 1996). Nervos sensoriais possuem canais de íons de sódio dependentes de voltagem, incluindo Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 (Revilac, 2017).

No estudo publicado pelo nosso grupo em 2020 (Prazeres et al), relatamos que os camundongos que tiveram os neurônios sensoriais depletados nos tumores do tipo melanoma, apresentaram um aumento do tamanho do tumor quando comparado aos animais que não tiveram os neurônios sensoriais depletados. Da mesma forma, em um outro estudo do nosso grupo publicado em 2021, (Costa et al), relatamos resultados semelhantes com a ativação e inibição de neurônios sensoriais através de técnicas de quimiogenética, nos tumores do tipo melanoma.

Com o objetivo de identificar novos alvos terapêuticos, o microambiente tumoral mamário vem sendo amplamente estudado. Entretanto, o papel do sistema nervoso, principalmente das fibras sensoriais, ainda é pouco discutido e por vezes divergentes.

Deste modo, é crucial identificar o papel dos nervos sensoriais, durante o desenvolvimento tumoral mamário e sua interação com o microambiente tumoral, bem como a contribuição das fibras nervosas sensoriais na formação de sítios metastáticos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da inervação sensorial em tumores de mama induzidos pelo inóculo de células E0771 e sua participação na progressão tumoral e no desenvolvimento de metástases.

4.2 Objetivos Específicos

- 1- Caracterizar os tumores mamários murinos E0771;
- 2- Realizar a estimulação químiogenética dos nervos sensoriais usando Clozapina N-óxido de (CNO) e avaliar a progressão tumoral;
- 3- Avaliar marcadores de transição epitélio mesênquima: E-caderina, N-caderina, Vimentina e Fibronectina, nos tumores primários E0771, através de imunofluorescência;
- 4- Avaliar a porcentagem de fibras colágenas do tipo I e tipo III nos tumores primários murinos E0771, por coloração de picrosirius RED;
- 5- Avaliar taxas de angiogênese (Fator VIII) e proliferação celular (Ki67) nos tumores primários E0771;
- 6- Avaliar a formação de sítios metastáticos após ativação da inervação sensorial;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Os animais C57BL/6J do tipo selvagem (WT) fêmeas foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os camundongos Nav1.8-Cre foram obtidos da Infrafrontier (EMMA ID: 04 582). Os camundongos CAG-LSL-hM3Dq-DREADD (hM3Dq), DREADDs de ativação (hM3Dq) foram obtidos do Jackson Laboratories (Jax) (Bar Harbor, ME). Foi realizado o cruzamento dos animais Nav1.8-Cre⁺ com os animais hM3Dq, gerando animais Nav1.8-Cre⁺/hM3Dq. Os animais controle utilizados foram Nav1.8-Cre⁻/hM3Dq.

Para os experimentos, os camundongos fêmeas com idade de 12 semanas. As mesmas foram alojadas no Biotério do Departamento de Patologia do ICB / UFMG e foram mantidas sob ciclo de luz controlado (12:12 horas de ciclo claro/ escuro), tendo livre acesso a água e ração.

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 69/2023.

5.2 Manutenção dos animais

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e ambiente controlado com livre acesso a água e ração *ad libitum*, durante todo o período do experimento. Para a realização deste estudo os animais foram divididos em grupos (caixas) com 3 (três) e/ou 4 (quatro) animais cada. Para o experimento as fêmeas foram separadas por grupos (superativado e controle). Após a divisão dos grupos, os animais foram observados diariamente, verificando: mortalidade, sinais clínicos, variações no peso corporal e no consumo de água e ração.

5.3 Genotipagem para hM3Dq e Nav 1.8

Para a genotipagem dos animais foi realizada PCR convencional. Para isso, uma pequena amostra da cauda foi retirada e, em seguida, extraiu-se da amostra o material genético pelo método de NaOH. Para os mix de PCR adicionamos às amostras: 12,5 µl Taq2x Master Mix RED, 9,5µl de H₂O, 0,5 µl de primer hM3Dq primer *Forward* – 5'CGA AGT TAT TAG GTC CCT CGA C 3' e *-Reverse* – 5' TAG CGA TTG TGG GAT GA 3'. Para genotipagem dos animais Nav1.8 Cre foi utilizado primer Mutante *Forward* – 5'AACATGCTTCATCGTCGG 3' Mutante *Reverse* – 5'TTCGGATCATCAGCTACACC 3'.

Após, as amostras foram levadas no termociclador onde a reação foi realizada sob as seguintes condições: uma ativação de 10 min a 95°C, amplificação de 45 ciclos de 30 segundos a 95°C com 1 minuto a 60°C, e um resfriamento de 20 segundos até atingir 4°C. Em seguida, 10µl de cada amostra foram colocados em gel de agarose a 3% com brometo de etídio. Na sequência, as amostras foram submetidas a eletroforese por aproximadamente 35min e em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

5.4 Linhagem celular e cultura

A linhagem de tumor de mama murino E0771, ATCC CRL-3461, foi fornecida pela professora Liza Figueiredo Felicori Vilela do departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG. A linhagem celular foi cultivada a 37° C em 5% de CO₂ com meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco), 1ml de anti/anti 100X (Gibco).

5.5 Análise do crescimento tumoral in vivo

Para o crescimento do tumor, os camundongos fêmeas de 12 semanas de idade foram injetadas com 1×10^6 células E0771 suspensas em PBS de forma ortotópica na almofada de gordura da 4ª glândula mamária. Comprimento (L) e largura (W) foram medidos todos dias para determinar o volume (V) do tumor, através da fórmula $V = 0,5 \times (L \times W^2)$ (Gast et al., 2018).

5.6 Ativação da inervação sensorial

A estimulação dos neurônios sensoriais foi realizada com clozapina-N-óxido (CNO) (1 mg/kg em solução salina) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Tal droga foi administrada diariamente, por via intraperitoneal usando uma agulha de calibre 25 para avaliar o efeito da ativação neuronal na progressão de tumores mamários nos animais Nav1.8Cre+/hM3Dq. Camundongos controle Nav1.8Cre-/hM3Dq foram injetados igualmente com CNO. A administração do CNO foi realizada todos os dias a começar no dia da indução do tumor até o dia da eutanásia dos animais, conforme figura 17. Para confirmar a eficiência da ativação dos nervos sensoriais, os camundongos foram submetidos a testes comportamentais

para medir as respostas térmicas e mecânicas reduzidas. Para o calor nocivo, foi utilizado o teste de movimento da cauda (Tail Flick), conforme descrito por Pacheco e colaboradores em 2019. Para o teste mecânico foi utilizado o teste Randall e Selitto (Randall; Selitto, 1957) usando um analgesímetro com um prensador de pata em forma de cone com uma ponta arredondada para aplicar uma força linearmente crescente na pata traseira. O peso em gramas (g) e o tempo em segundos (s) necessários para desencadear a resposta nociceptiva foram determinados como o limiar nociceptivo.

5.7 Imunofluorescência e microscopia

Os tumores foram retirados e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas a 4°C. Posteriormente, foram colocados em sacarose 30% por 48 horas a 4°C. Em seguida, foram, foram incluídos em This Tissue-Tek® optimum cutting temperature (O.C.T.), os blocos foram cortados em espessura de 12µm em criostato. As criosecções foram bloqueadas por 2 horas em 4% BSA em PBS + 0,5% Triton e imuno marcadas com os anticorpos dispostos na tabela 2, os respectivos anticorpos secundários estão dispostos na tabela 3. Os cortes ainda foram corados com DAPI e montados em meio de montagem de fluorescência Dako. As secções coradas foram fotografadas em um microscópio confocal Zeiss LSM 880 invertido (CAPI). Para realizar as quantificações utilizamos Fiji software®.

Anticorpo Primário	Marca	Nº de Cat.	Diluição	Host
E-caderina	Invitrogen	#14-3249-82	1:200	Rato
N-caderina	Thermo	MA1-91128	1:200	Camundongo
Fibronectina	Invitrogen	#PA5-29578	1:200	Coelho
Vimentina	ABCAM	AB8978	1:200	Camundongo

Tabela 2: Anticorpos primários utilizados na imunofluorescência.

Anticorpo Secundário	Marca	Nº de Cat.	Host	Diluição
anti rato Alexa Fluor 488	Invitrogen	A21470	Cabra	1:1000
anti camundongo Alexa Fluor 647	Thermo	A315571	Burro	1:1000
anti coelho Alexa Fluor 488	Thermo	A11011	Cabra	1:1000

Tabela 3: Anticorpos secundários utilizados na imunofluorescência.

5.8 Imuno-Histoquímica

Para as análises de imuno-histoquímica foram utilizados blocos parafinados com as amostras de tumores. Os blocos foram seccionados em cortes de 4µm e colocados em lâminas comuns para IHQ. Após isso, as amostras foram desparafinizadas, em seguida os cortes foram submetidos à recuperação antigênica induzida por calor com tampão citrato de sódio (pH 6,0) em banho-maria a 96°C por 20 min. O antígeno foi imuno detectado utilizando o sistema de detecção anti-camundongo/anti-coelho (Novolink Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10% em álcool metílico e proteínas inespecíficas foram bloqueadas com solução láctea a 3% em albumina sérica bovina (BSA). As lâminas foram cobertas com anticorpos primários anti RE+, anti RP+, Fator VII e anti Ki67+ (conforme tabela 4) e foram incubadas durante a noite a 4°C. Os reagentes foram aplicados manualmente e a imunorreatividade foi visualizada pela incubação das lâminas com o cromógeno diaminobenzidina (DAB Substrate System, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 1 minuto e contrastada com Hematoxilina de Harris, os desidratados e montados em meio sintético. Amostras de glândulas mamárias de camundongos previamente testadas foram utilizadas como controles positivos, conforme proposto por Diniz-Gonçalves e colaboradores em 2023. Após as lâminas foram levadas ao microscópio de luz com câmera acoplada e fotografadas na objetiva de 40x. Receptores de estrogênio (RE+) e progesterona (RP+) foram considerados apenas as marcações nucleares conforme Harbeck e colaboradores (2019). Para o marcador de células endoteliais (Fator VIII) foram realizadas 3 fotos por corte e em seguida foram contados o número de vasos sanguíneos utilizando ImageJ conforme Maeda e colaboradores (1995). Já para o marcador de Ki67 foram realizadas duas fotos por corte, em seguida foram contadas até mil células e em seguida foi feita

a porcentagem de células marcadas em mil células.

Anticorpo	Marca	Nº de Cat.	Clone	Diluição
Ki67	Invitrogen	MA5-14520	SP6	1:100
Fator VIII	Dako	A0082	Policlonal	1:800
Receptor de Estrógeno	Invitrogen	MA1-310	33	1:1200
Receptor de Progesterona	Invitrogen	Ma1-410	PR-AT 4.14	1:200

Tabela 4: Anticorpos utilizados na imunohistoquímica.

5.9 Análise Histopatológica

Para as análises histopatológicas do cérebro, rins, fígado, baço, pâncreas, coração e tumores foram coletados, colocados em formol tamponado a 10% por 24h, em seguida clivados, incluídos em cassetes e emblocados com parafina. Os tumores foram coletados e processados de forma igual. Já os fêmures foram coletados, colocados em formol tamponado a 10% por 24h e em seguida foram descalcificados usando EDTA a 10% e pH 8, em seguida foram clivados, incluídos em cassetes e emblocados com parafina. Posteriormente, as amostras foram cortadas em micrótomo. Para todas as amostras (órgãos, fêmures e tumores) foi respeitada a espessura de corte de 4µm. Em seguida, as amostras foram coradas com Eosina e Hematoxilina.

5.10 Coloração de PicroSirius Red

Para a coloração de *Picrosirius Red* foram utilizados blocos parafinados com as amostras de tumores. Os blocos foram seccionados em cortes de 4µm e as amostras foram desparafinizadas utilizando xilol 100%, seguido de álcool 100%, 90%, 80% e 70%, 5 minutos em cada bateria, respectivamente. Em seguida, as amostras foram colocadas na solução de *Picrosirius red* (Sigma). Após as lâminas foram montadas com meio de montagem, em seguida levadas ao microscópio Olympus BX41, software Spot 3.4, e fotografadas na objetiva de 40x e câmera com luz polarizada (Spot Insight). Foram realizadas dez imagens em campos aleatórios da porção intratumoral e dez imagens em campos aleatórios da pseudocápsula, a qual chamamos de região peritumoral. As fibras de colágeno foram quantificadas como proporção de colágeno como as já realizadas por de Castro Santos e colaboradores em 2023.

5.11 SPECT -Single photon emission computed tomography

Para a realização o SPECT foram realizados os seguintes passos:

5.11.1 Radiomarcção para teste de afinidade do HYNIC- β Ala-Bombesina (^{99m}Tc) pelas células tumorais E0771.

Em um frasco foram pesados 5mg de EDDA e 20mg de tricina, solubilizando-os em 0,5mL de salina. Em seguida foram adicionados 5 μ g do complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) e 10 μ l de uma solução de SnCl₂ em HCL 0,25N (1mg/ml). Em seguida o pH foi ajustado para 7-8, utilizando solução aquosa de NaOH a 0,1 N. Em seguida o frasco foi lacrado e o ar do seu interior retirado para promoção do vácuo. Posteriormente foi acrescentado 74MBq de Na^{99m}TcO₄⁻. A mistura reagente foi mantida em banho maria fervente (100°C) por 15 minutos e resfriada em temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 428 μ l de salina no frasco, obtendo-se ao final do processo de radiomarcção, a concentração de 0,3 nmol de HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) (^{99m}Tc) em 0,1 mL de solução, conforme já realizado por Carlesco e colaboradores em 2015.

5.11.2 Rendimento da Radiomarcção

Os rendimentos de radiomarcção foram determinados por cromatografia de camada fina (TLC) em tiras de sílica gel (Merck®, Alemanha). Metiletilcetona foi utilizada para determinação do tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e uma solução de acetonitrila:água (1:1) foi utilizada para quantificação do tecnécio hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$). A radioatividade foi medida utilizando um contador gama automático (Wizard, Finlândia), conforme já realizado por Carlesco e colaboradores em 2015.

5.11.3 Estudo da biodistribuição in vivo

Aos 21 dias após a inoculação de células E0771 os camundongos foram anestesiados com uma solução de 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina, alíquotas contendo 7,4 MBq de HYNIC- β Ala-Bombesina (7–14) (^{99m}Tc) foram administradas na veia da cauda de camundongos portadores de tumor E0771 (n = 3). Após 10 minutos de administração do peptídeo radiomarcado, os camundongos foram colocados em câmara gama e mantidos em decúbito dorsal por 10 minutos para avaliar a distribuição do HYNIC- β Ala-Bombesina (7–14)

(99m Tc). Seis horas após a administração do HYNIC- β Ala-Bombesina (7–14) (99m Tc), os camundongos foram novamente anestesiados com 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina, e colocados novamente na gama câmara para avaliar a distribuição da bombesina radiomarcada. Este mesmo processo foi repetido aos vinte e oito dias após a inoculação de E0771.

5.11.4 Estudo da biodistribuição ex vivo

Aos vinte e oito dias após a inoculação de E0771 repetimos os passos do item 5.11.3, em seguida realizamos a eutásia dos camundongos, com a retirada dos órgãos e tecidos de interesse, como, baço, pâncreas, rins, fígado, coração, cérebro, pulmão, intestino e tumor. Em seguida, foram colocados separados na gama câmara e avaliado a distribuição de HYNIC- β Ala-Bombesina (7–14) (99m Tc). Posteriormente esses órgãos e tecidos foram pesados e levados a um contador gama automático (Wizard, Finlândia). Os resultados foram quantificados como porcentagem da dose injetada por grama de tecido (% ID/g), conforme já realizado por Carlesco e colaboradores em 2015.

5.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0. (GraphPad Software, San Diego, CA). O teste Shapiro-Wilk foi realizado para verificar a normalidade dos dados. Para os dados paramétricos não pareados, foi utilizado os testes t de Student para identificar diferenças entre dois grupos independentes. Os resultados observados serão significativos quando $p < 0,05$ ou $p < 0,01$.). Os dados serão apresentados em média $\pm$ desvio padrão (SD).

6. RESULTADOS

Tumores E0771 não apresentam receptores para estrógeno nem para progesterona

Para caracterizar os tumores mamários murinos E0771, as fêmeas foram inoculadas ortotopicamente com células E0771, no quarto coxim de tecido adiposo mamário, após 28 dias de crescimento, as fêmeas foram eutanasiadas e os tumores coletados e corados conforme itens 5.8 e 5.9.

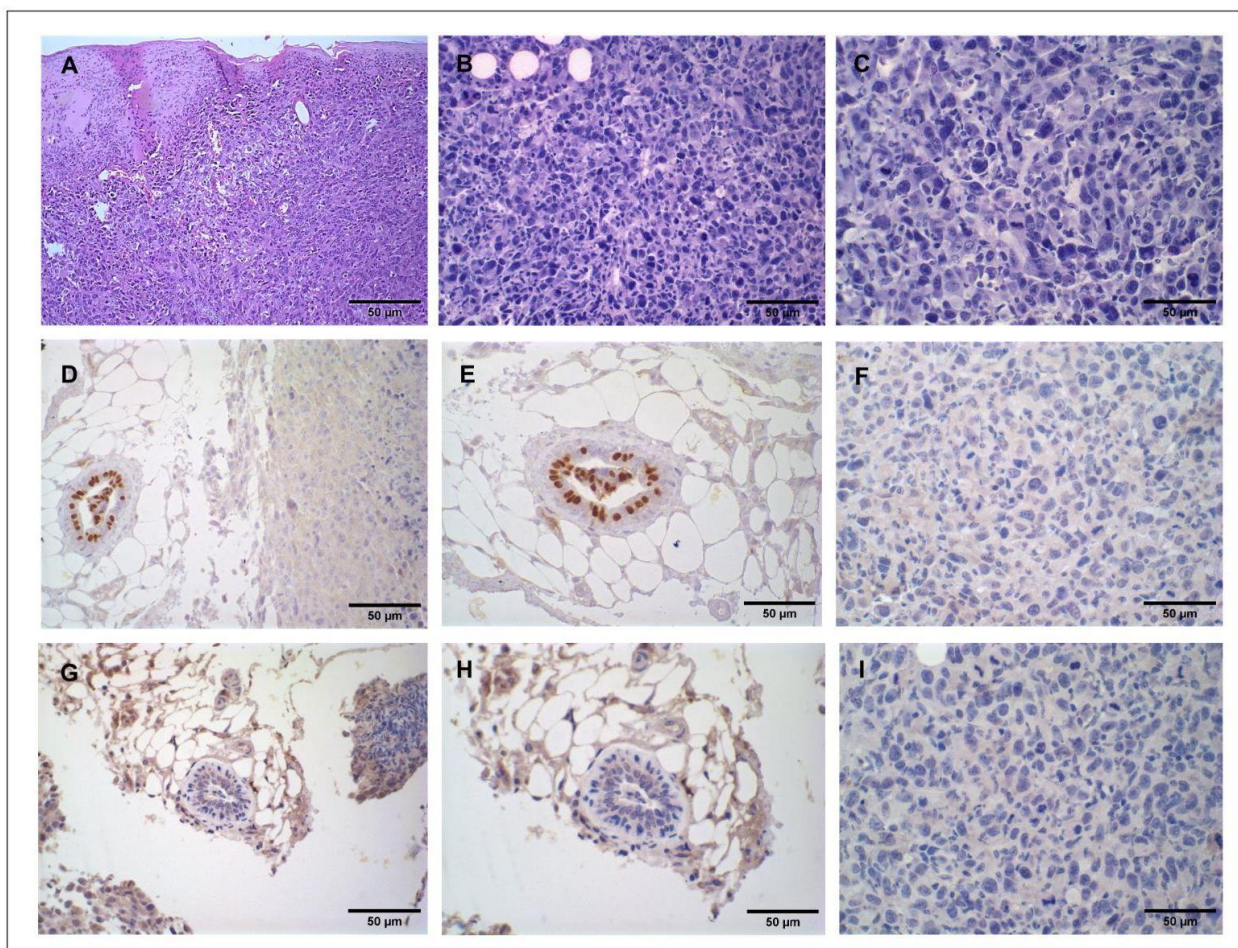


Figura 15: Tumores E0771 apresentam características de tumores triplo negativos.

Características histológicas dos tumores E0771 e comparação com tecido mamário normal **A** Tumor de mama E0771, coloração de HE. Aumento de 20x, barra de escala de 50µm. **B** Tumor de mama E0771, com características de arranjo sólido, com escasso estroma fibrovascular. Aumento de 40x, barra de escala de 50µm. **C** Tumor de mama E0771, as células apresentam elevado pleomorfismo celular nuclear, com uma relação proeminente entre núcleo, citoplasma e núcleolos. Além disso, observa-se uma frequência elevada de figuras de mitose, indicando uma atividade celular intensa. Aumento de 60x, barra de escala de 50µm. **D** IHQ de tecido mamário normal, com marcação para RP. Aumento de 40x. Barra de escala de 50µm. **E** IHQ

de tecido mamário normal, com marcação para RP, observa-se marcação intensa no núcleo das células. Aumento de 60x. Barra de escala de 50um. **F** IHQ de tumor E0771 marcado com anticorpo para RP, revelou ausência de marcação nuclear nas células tumorais. Aumento de 60x. Barra de escala de 50um. **G** IHQ de tecido mamário normal, com marcação para RE. Aumento de 40x. Barra de escala de 50um. **H** IHQ de tecido mamário normal, com marcação para RE, observa-se marcação no núcleo das células. Aumento de 60x. Barra de escala de 50um. **I** IHQ de tumor E0771 marcado com anticorpo para RE, revelou ausência de marcação nuclear nas células tumorais. Aumento de 60x. Barra de escala de 50um.

CNO ativa as fibras nervosas sensoriais dos animais Nav1.8

Para examinar se os neurônios sensoriais foram ativados, foi utilizado o modelo de camundongo Nav1.8-Cre+/hM3Dq. Com esse modelo foi possível realizar a ativação das fibras nervosas sensoriais, nos camundongos Nav1.8-Cre+, após a remoção do cassete loxP-stop-loxP por ação da recombinase Cre, nos camundongos hM3Dq apenas neurônios sensoriais Nav1.8⁺ foram ativados após a aplicação do CNO. Os animais, tanto do grupo controle Nav1.8-Cre-/hM3Dq, como do grupo tratado Nav1.8-Cre+/hM3Dq, foram inoculadas ortotopicamente com células E0771, no quarto coxim de tecido adiposo mamário. Aos nove dias e aos vinte e sete dias após a inoculação das células E0771 e administração i.p. de CNO, foram realizados os testes comportamentais Randall Selitto e Tail Flick para avaliar se as fibras nervosas sensoriais eram ativadas pelo CNO.

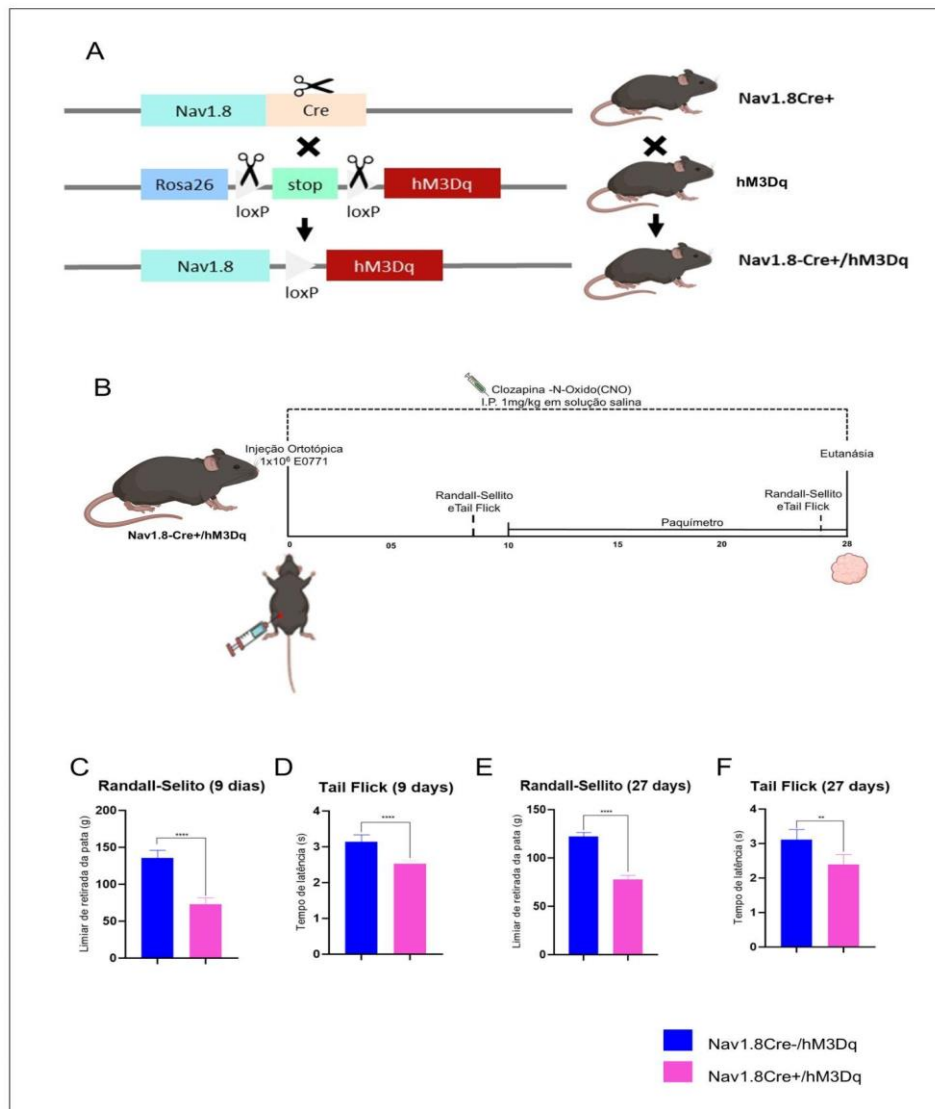


Figura 16: CNO ativa as fibras nervosas sensoriais dos animais Nav1.8Cre+/hM3Dq. A. Representação esquemática do cruzamento entre os camundongos Nav1.8-Cre⁺ e camundongos DREADDs hM3Dq, para gerar os animais experimentais Nav1.8-Cre⁺/hM3Dq os quais possuem receptores para o CNO e dessa forma podem ser ativados após a administração da droga. **B.** Representação do esquema experimental para crescimento ortotópico do tumor de mama e aplicação diária de CNO. Camundongos fêmeas Nav1.8-Cre⁺/hM3Dq receberam a injeção de 1×10^6 células E0771 no coxim adiposo da 4^a glândula mamária e aplicação de CNO diariamente (1mg/kg em solução salina) intraperitoneal durante 28 dias (n=7). O grupo controle com camundongos fêmeas Nav1.8-Cre⁻/hM3Dq foi tratado igualmente (n=7). As eutanásias e análises dos tumores e órgãos foram realizadas aos 28 dias após a injeção das células. **C.** Quantificação do teste de Randall Selitto aos 9 dias após a inoculação das células E0771 e administração diária de CNO, para determinar o limiar de retirada da pata (Nav1.8-Cre⁻/hM3Dq: $62,78 \pm 75,22$ g; Nav1.8-Cre⁺/hM3Dq $5,58 \pm 50,34$ g), $p = 0,0001$. **D.** Quantificação do teste Tail Flick aos 9 dias após a inoculação das células E0771 e administração diária de CNO, para determinar o tempo de latência (Nav1.8-Cre⁻/hM3Dq: $0,62 \pm 0,81$ s; Nav1.8-Cre⁺/hM3Dq $0,08 \pm 0,42$ s). $p = 0,0001$. **E.** Quantificação do teste de Randall Selitto aos 27 dias após a inoculação das células E0771 e administração diária de CNO, para determinar o limiar de retirada da pata (Nav1.8-Cre⁻/hM3Dq: $44,72 \pm 50,18$ g; Nav1.8-Cre⁺/hM3Dq $2,45 \pm 39,26$ g). $p = 0,0001$. **F.** Quantificação do teste Tail Flick aos 27 dias após a inoculação das células E0771 e administração diária de CNO, para determinar o tempo de latência (Nav1.8-Cre⁻/hM3Dq: $0,71 \pm 1,08$ s; Nav1.8-Cre⁺/hM3Dq $0,16 \pm 0,34$ s). $p = 0,0015$.

A ativação das fibras nervosas sensoriais Nav1.8 altera o volume tumoral

Para examinar se os neurônios sensoriais ativados interferiram no crescimento e volume tumoral, foi utilizado o modelo de camundongo Nav1.8-Cre+/hM3Dq inoculados com células de tumores mamários murinos E0771 e tendo as fibras nervosas sensoriais ativadas com a aplicação do CNO. Para aferir o crescimento tumoral utilizamos paquímetro, as medidas foram iniciadas no décimo dia após a inoculação das células até o dia da eutásia. Para verificar se a ativação das fibras nervosas sensoriais interfere no peso dos animais, foram realizadas diariamente as pesagens, porém não foi visualizado diferença no peso dos animais após a ativação dessas células.

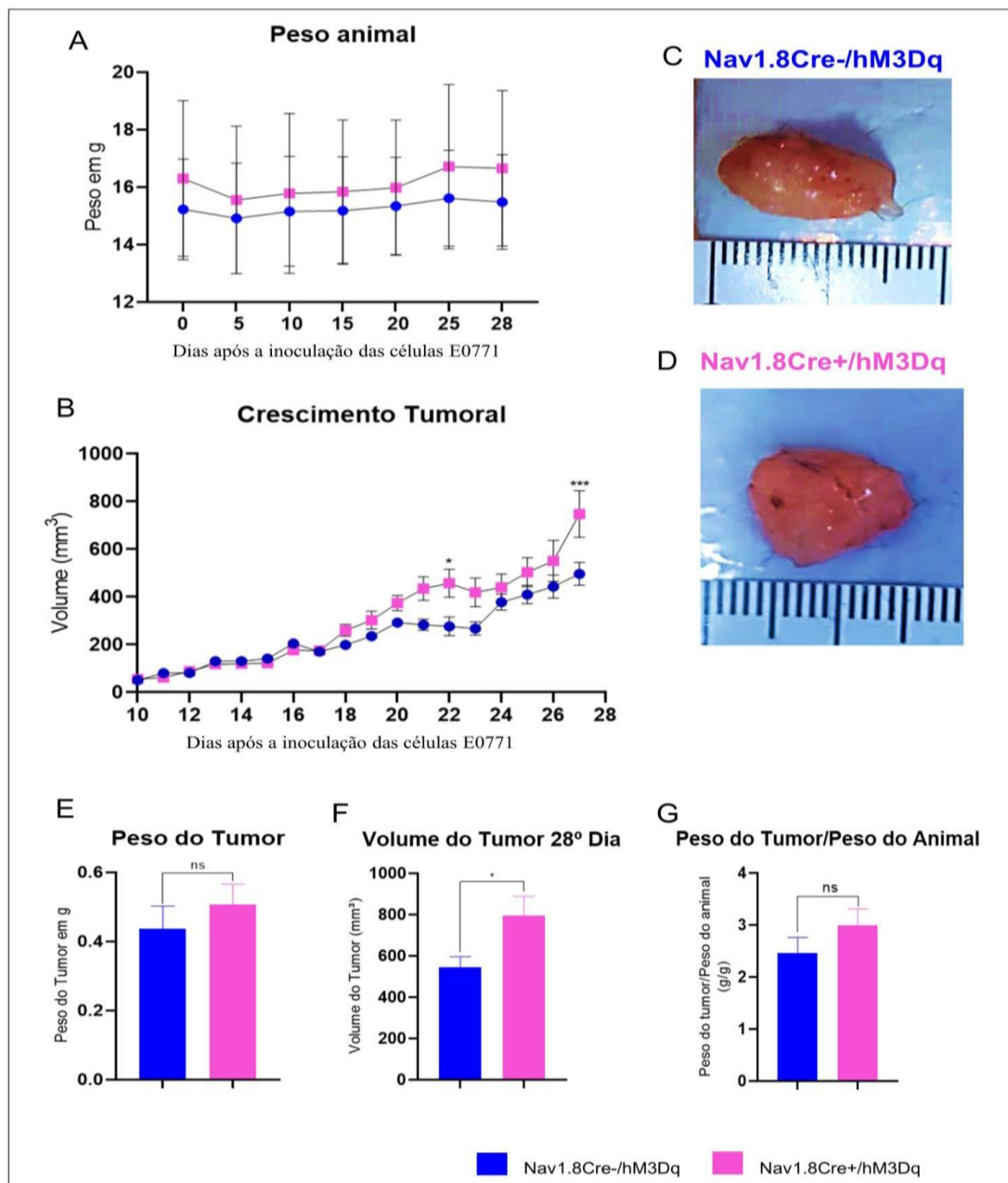


Figura 17: A ativação das fibras nervosas sensoriais Nav1.8 altera o volume tumoral. A Peso dos animais após a inoculação das células E0771. **B** Curva de crescimento tumoral, volume foi medido com paquímetro após o 10º dia após inoculação das células E0771. O primeiro pico de aumento do volume ocorre no 22º dia após a inoculação, $p=0,028$ e o segundo pico no 28º dia após a inoculação, $p=0,0001$. $n=7$. **C** Imagem macroscópica representativa do tumor de mama E0771 Nav1.8Cre-/hM3Dq após dissecação. **D** Imagem macroscópica representativa do tumor de mama E0771 Nav1.8Cre+/hM3Dq após dissecação. **E** Peso do tumor no 28º dia. **F** Volume do tumor apenas do 28º dia. **G** Relação peso do animal/peso do tumor.

Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de E-caderina, N-caderina no microambiente tumoral

Para avaliar se as células do tumor primário estavam mudando o perfil de epitelial para mesenquimal foi realizado uma imunofluorescência com os anticorpos anti E-caderina (marcador para células epiteliais) e anti N-caderina (marcador para células mesenquimais). Foram utilizadas camundongos fêmeas Nav1.8-Cre+/hM3Dq inoculados com células de tumores mamários murinos E0771 e tendo as fibras nervosas sensoriais ativadas com a aplicação do CNO, e grupo controle Nav1.8-Cre-/hM3Dq inoculadas com E0771 e injetadas com CNO igualmente. No grupo dos camundongos com as fibras nervosas sensoriais ativadas foi observado que os tumores perdem expressão de E-caderina e ocorre um aumento de células marcadas para N-caderina, já no grupo que não tem as fibras nervosas ativadas ocorre o contrário, maior marcação de células para E-caderina e menor marcação de células para N-caderina. Não foi observado significância estatística entre os grupos para células co-expressando os dois marcadores ao mesmo tempo.

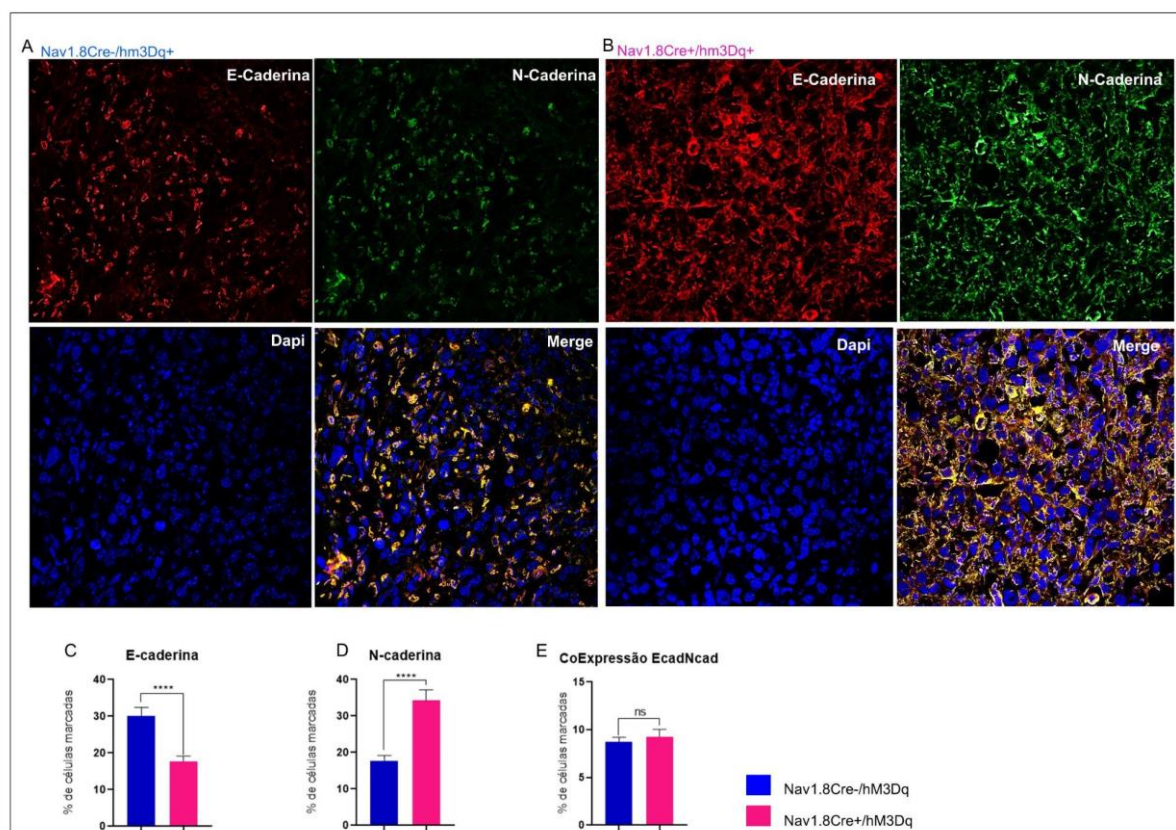


Figura 18: Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de E-caderina, N-caderina no microambiente tumoral. A Imagens representativas de imunofluorescência de secções tumorais de camundongos do grupo controle Nav1.8Cre-/hM3Dq, marcados para E-Caderina

(vermelhor), N-Caderina (verde), núcleo (azul), células co-expressando as duas proteínas (amarelo). Aumento de 40x. n=7 **B** Imagens representativas de imunofluorescência de secções tumorais de camundongos com neurônios super ativados Nav1.8Cre+/hM3Dq marcados para E-Caderina (vermelhor), N-Caderina (verde), núcleo (azul), células co-expressando as duas proteínas (amarelo). Aumento de 40x. n=7 **C** Quantificação da porcentagem de células marcadas para E-Caderina intratumoral (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: 1539%; Nav1.8-Cre+/hM3Dq 8075%). p= 0,0001. **D** Quantificação da porcentagem de células marcadas para N-Caderina intratumoral (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: 844%; Nav1.8-Cre+/hM3Dq 1502%). p= 0,0001. n=7. **E** Quantificação da porcentagem de células marcadas tanto para E-Caderina como N-Caderina intratumoral (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: 1147%; Nav1.8-Cre+/hM3Dq 1199%). p= 0,0001. n=7.

Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de Fibronectina no microambiente tumoral

Para avaliar se as células do tumor primário estavam mudando o perfil de epitelial para mesenquimal foi realizado uma imunofluorescência com os anticorpos anti vimentina (marcador para mesenquimais) e anti fibronectina (marcador para células mesenquimais). Foram utilizadas camundongos fêmeas Nav1.8-Cre+/hM3Dq inoculados com células de tumores mamários murinos E0771 e tendo as fibras nervosas sensoriais ativadas com a aplicação do CNO, e grupo controle Nav1.8-Cre-/hM3Dq inoculadas com E0771 e injetadas com CNO igualmente. No grupo dos camundongos com as fibras nervosas sensoriais ativadas foi observado que nos tumores ocorre um aumento de células marcadas para fibronectina, já no grupo que não tem as fibras nervosas ativadas ocorre o contrário, uma menor marcação de células marcadas para fibronectina. Não foi observado significância estatística entre os grupos para células marcadas para vimentina nem para células co-expressando os dois marcadores ao mesmo tempo.

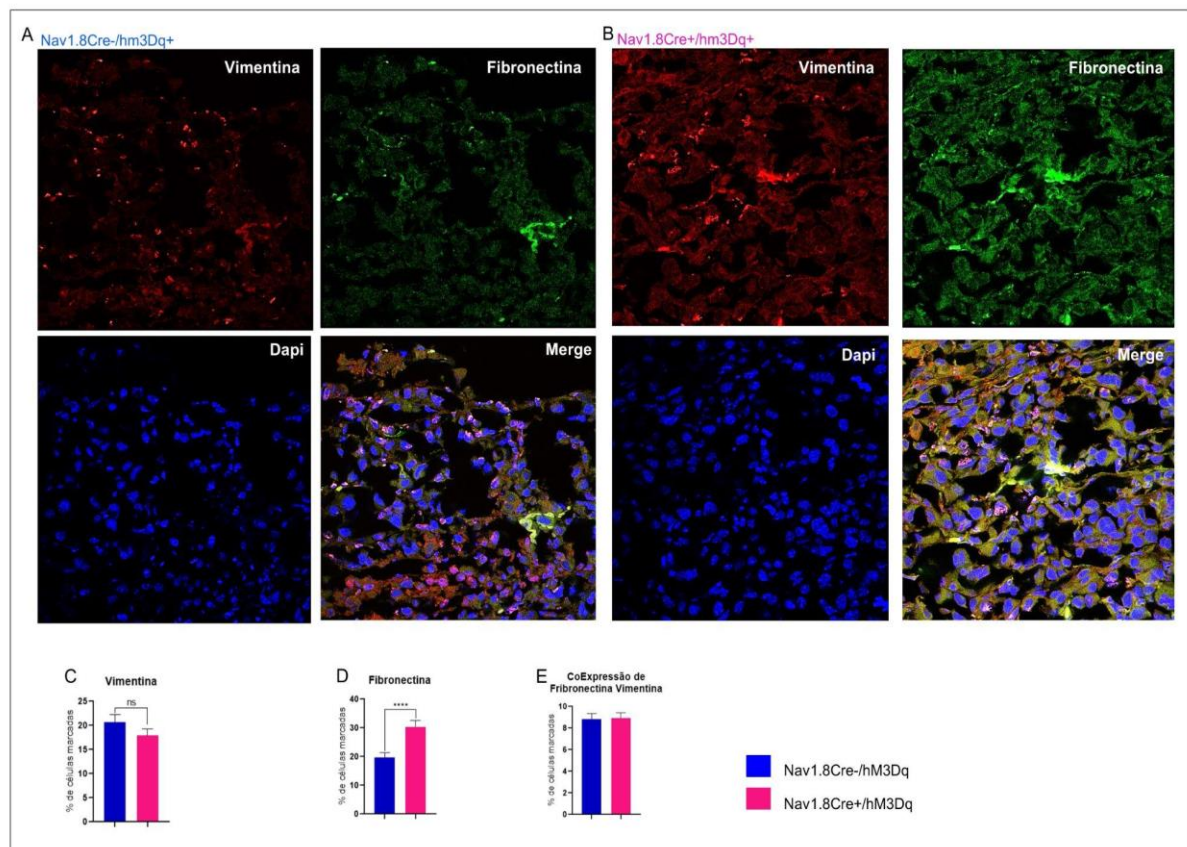


Figura 19: Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de Fibronectina no microambiente tumoral. A Imagens representativas de imunofluorescência de secções tumorais de camundongos do grupo controle Nav1.8Cre-/hM3Dq, marcados para Vimentina

(vermelhor), Fibronectina (verde), núcleo (azul), células co-expressando as duas proteínas (amarelo). Aumento de 40x. n=7. **B** Imagens representativas de imunofluorescência de secções tumorais de camundongos com neurônios super ativados Nav1.8Cre+/hM3Dq marcados para Vimentina (vermelhor), Fibronectina (verde), núcleo (azul), células co-expressando as duas proteínas (amarelo). Aumento de 40x. n=7. **C** Quantificação da porcentagem de células marcadas para Vimentina intratumoral (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: 1307%; Nav1.8-Cre+/hM3Dq 1039%). p= 0,1009. **D** Quantificação da porcentagem de células marcadas para Fibronectina intratumoral (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: 858%; Nav1.8-Cre+/hM3Dq 1488%). p= 0,0001. n=7. **E** Quantificação da porcentagem de células marcadas tanto para Vimentina como para Fibronectina intratumoral (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: 0,107%; Nav1.8-Cre+/hM3Dq 0,679%). p= 0,8753. n=7.

Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de fibras colágenas

Para avaliar as proporções de fibras colágenas do tipo I e tipo III foi realizada uma coloração de *picrosirius red* e visualizada em microscópio com luz polarizada, dessa forma, foi possível visualizar as fibras colágenas do tipo I em cores avermelhadas, enquanto as fibras colágenas do tipo III são visualizadas em tons verdes. Para isso, foram utilizados camundongos fêmeas Nav1.8-Cre+/hM3Dq inoculados com células de tumores mamários murinos E0771 e tendo as fibras nervosas sensoriais ativadas com a aplicação do CNO, e grupo controle Nav1.8-Cre-/hM3Dq inoculadas com E0771 e injetadas com CNO igualmente. Devido a esses tumores apresentarem uma pseudocápsula, a qual chamamos de porção peritumoral, as análises dessas duas porções foram feitas separadas, contudo, tanto na porção intratumoral como na pseudocápsula foi observado maiores quantidades de fibras de colágeno do tipo I nos animais que tiveram as fibras colágenas estimuladas, bem como maiores quantidades de colágeno total (colágeno I + colágeno III), enquanto os animais que não tiveram os nervos sensoriais ativadas apresentaram maiores quantidades de fibras colágenas do tipo III e menor quantidade de colágeno total. A diferença entre as porções intra e peritumoral foram as proporções de colágeno que na pseudocápsula apresenta quantidades maiores em relação à região intratumoral.

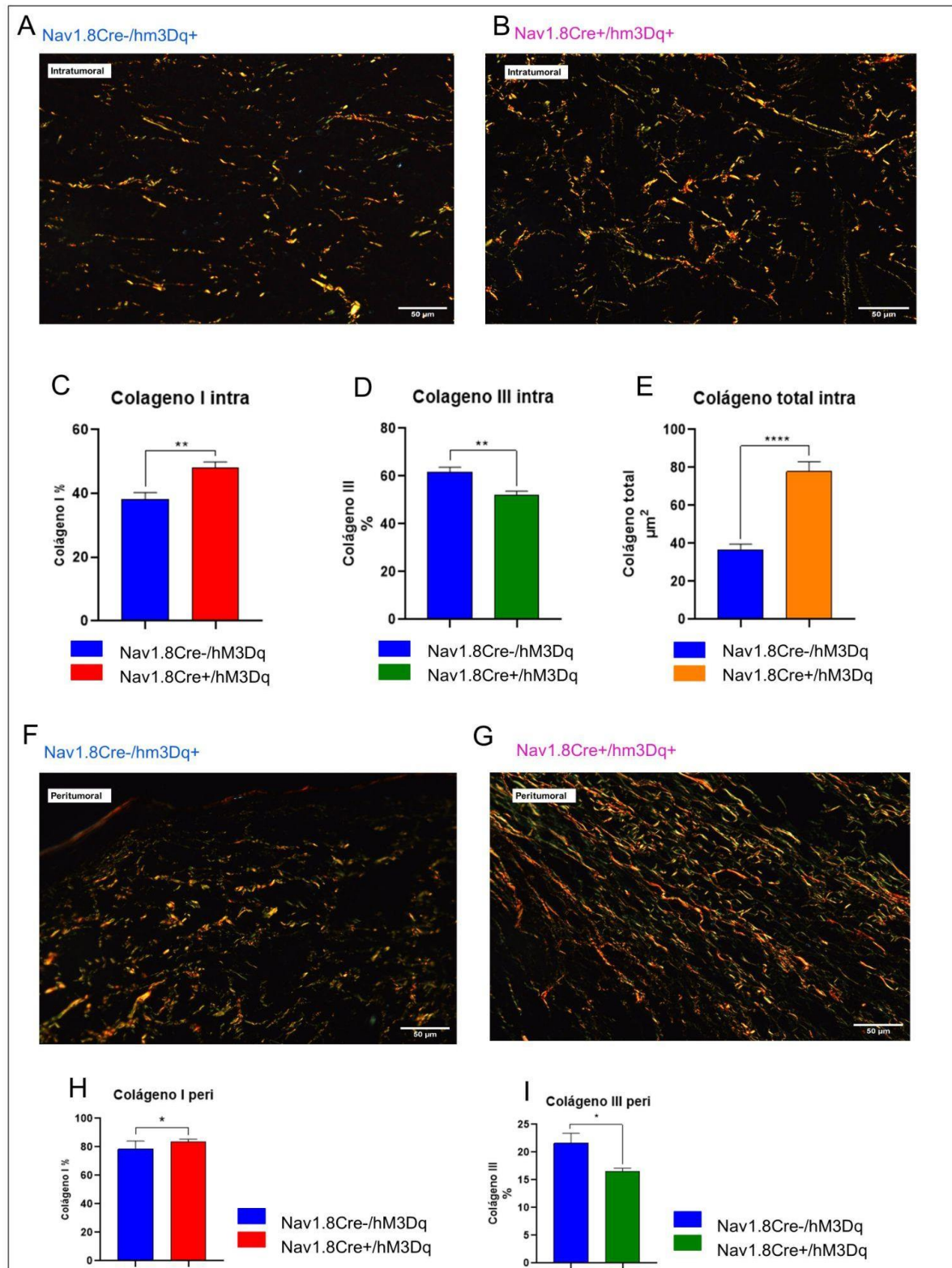


Figura 20: Ativação dos nervos sensoriais muda a expressão de fibras colágenas no microambiente tumoral. **A:** Fotomicrografia com luz polarizada intratumoral do grupo controle Nav1.8-Cre-/hm3Dq corado com picrosirius red em aumento de 40x, (Barra de escala 50um). **B:** Fotomicrografia com luz polarizada intratumoral do grupo tratado Nav1.8-Cre+/hm3Dq corado com picrosirius red em aumento de 40x, (Barra de escala 50um). **C.**

Quantificação do colágeno do tipo I intratumoral para determinar a proporção de colágeno (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: $9,84 \pm 4,18\%$; Nav1.8-Cre+/hM3Dq $2,69 \pm 15,61\%$), $p = 0,0018$. $n=7$.

D. Quantificação do colágeno do tipo III intratumoral para determinar a proporção de colágeno (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: $9,84 \pm 15,51\%$; Nav1.8-Cre+/hM3Dq $2,69 \pm 4,18\%$), $p = 0,0018$. $n=7$.

E. Quantificação do colágeno total intratumoral para determinar a quantidade de colágeno total (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: $41,24 \pm 28,66 \mu\text{m}^2$; Nav1.8-Cre+/hM3Dq $5,98 \pm 53,82 \mu\text{m}^2$), $p = 0,0001$. $n=7$.

F. Fotomicrografia com luz polarizada peritumoral do grupo controle Nav1.8-Cre-/hM3Dq corado com picrosirius red em aumento de 40x, (Barra de escala 50um).

G. Fotomicrografia com luz polarizada peritumoral do grupo tratado Nav1.8-Cre+/hM3Dq corado com picrosirius red em aumento de 40x, (Barra de escala 50um).

H. Quantificação do colágeno do tipo I peritumoral para determinar a proporção de colágeno (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: $5,12 \pm 1,14\%$; Nav1.8-Cre+/hM3Dq $1,89 \pm 9,11\%$), $p = 0,0145$. $n=7$.

I. Quantificação do colágeno do tipo III peritumoral para determinar a proporção de colágeno (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: $5,07 \pm 9,05\%$; Nav1.8-Cre+/hM3Dq $1,89 \pm 1,09\%$), $p = 0,0154$. $n=7$.

A ativação das fibras nervosas sensoriais altera as taxas de proliferação celular, mas não altera taxas de angiogênese

Para avaliar as taxas de proliferação e angiogênese foi realizado imunohistoquímica com anticorpos anti-ki67 e anti fator VIII, respectivamente. Para isso, foram utilizados camundongos fêmeas Nav1.8-Cre+/hM3Dq inoculados com células de tumores mamários murinos E0771 e tendo as fibras nervosas sensoriais ativadas com a aplicação do CNO, e grupo controle Nav1.8-Cre-/hM3Dq inoculadas com E0771 e injetadas com CNO igualmente. Foi observado que quando as fibras nervosas sensoriais foram ativadas houve um aumento da proliferação celular em relação ao grupo que não tinha a inervação sensorial superestimada. Em relação a quantidade de micro vasos intratumorais, não observamos significância estatística entre os grupos.

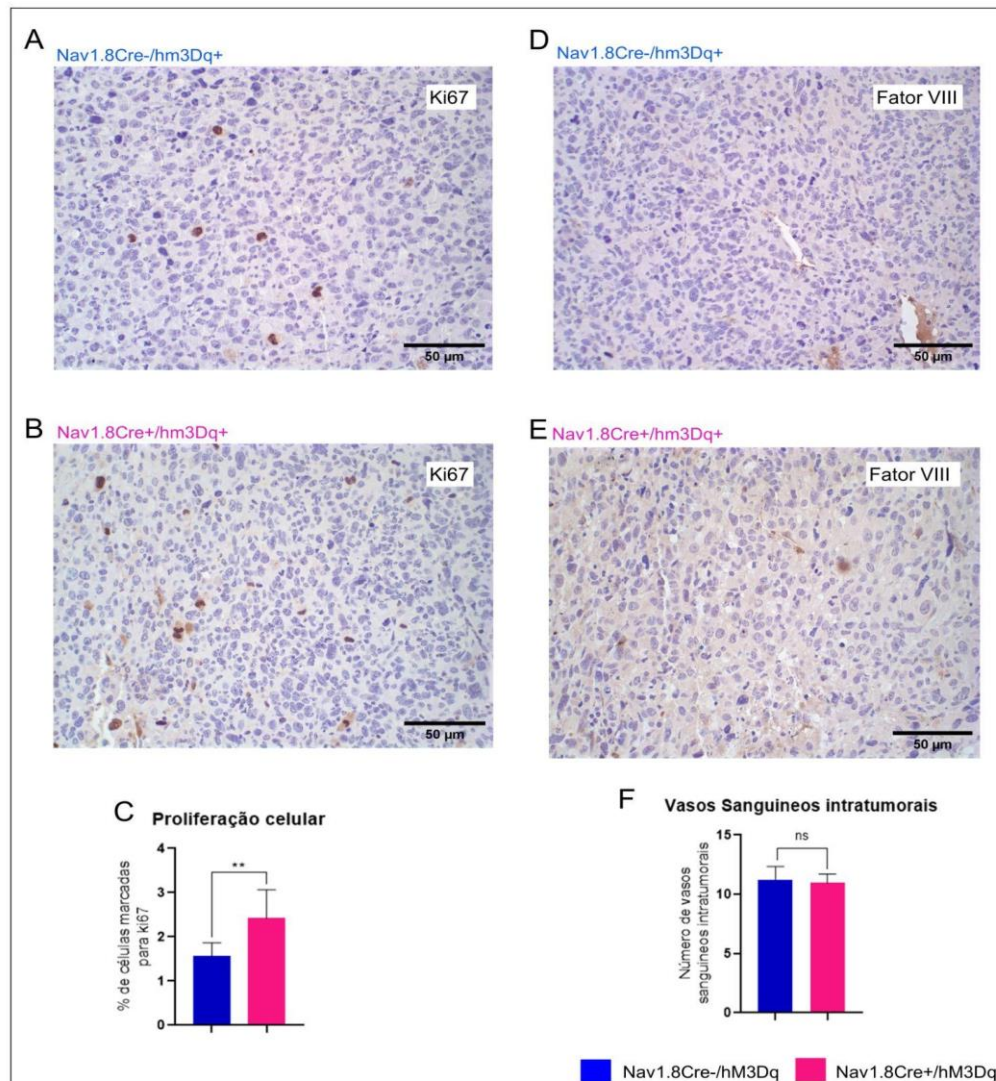


Figura 21: A ativação das fibras nervosas sensoriais altera as taxas de proliferação celular, mas não altera taxas de angiogênese. A Imagens representativas de imuno -histoquímica de

secções tumorais de camundongos Nav1.8Cre-/hM3Dq, marcadas para proliferação celular (Ki67 - células marcadas com núcleos acastanhados). aumento de 40x, (Barra de escala 50um).

B Imagens representativas de imuno -histoquímica de secções tumorais de camundongos Nav1.8Cre+/hM3Dq, marcadas para proliferação celular (Ki67 - células marcadas com núcleos acastanhados). Aumento de 40x, (Barra de escala 50um)

D Imagens representativas de imuno -histoquímica de secções tumorais de camundongos Nav1.8Cre-/hM3Dq, marcadas para células endoteliaes (Fator VIII - células marcadas em tons acastanhados). Aumento de 40x, (Barra de escala 50um).

E Imagens representativas de imuno -histoquímica de secções tumorais de camundongos Nav1.8Cre+/hM3Dq, marcadas para células endoteliaes (Fator VIII - células marcadas em tons acastanhados). Aumento de 40x, (Barra de escala 50um)

C Quantificação de células marcadas para ki67 intratumoral para determinar a porcentagem de células proliferativas (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: $0,8614 \pm 0,6506\%$; Nav1.8-Cre+/hM3Dq $0,7341 \pm 2,373\%$), $p= 0,0098$. n=7.

F Quantificação de células marcadas para Fator VIII intratumoral para determinar a quantidade de vasos sanguíneos. $p=0,6472$. n=7.

A ativação das fibras nervosas sensoriais altera metástases hepáticas, porém não foram observadas alterações em demais órgãos

Para analisar metástases espontâneas foram realizadas análises histopatológicas de órgãos como fígado, rins, pâncreas, baço, cérebro, coração e fêmur. Nos cortes analisados de fígado foi observado, formação de sítios metastáticos; focos metastáticos (número de focos) e células isoladas (de uma até quatro células foi considerado célula isolada). Foram utilizadas camundongos fêmeas Nav1.8-Cre+/hM3Dq inoculados com células de tumores mamários murinos E0771 e tendo as fibras nervosas sensoriais ativadas com a aplicação do CNO, e grupo controle Nav1.8-Cre-/hM3Dq inoculadas com E0771 e injetadas com CNO igualmente. Foi observado que quando as fibras nervosas sensoriais foram ativadas houve um aumento do número de células isoladas, bem como aumento do número de focos metastáticos, enquanto no grupo que não teve as fibras nervosas sensoriais ativadas apresentaram menor número de focos metastáticos, contudo apresentam maiores áreas metastáticas em relação ao grupo que teve as fibras nervosas sensoriais ativadas.

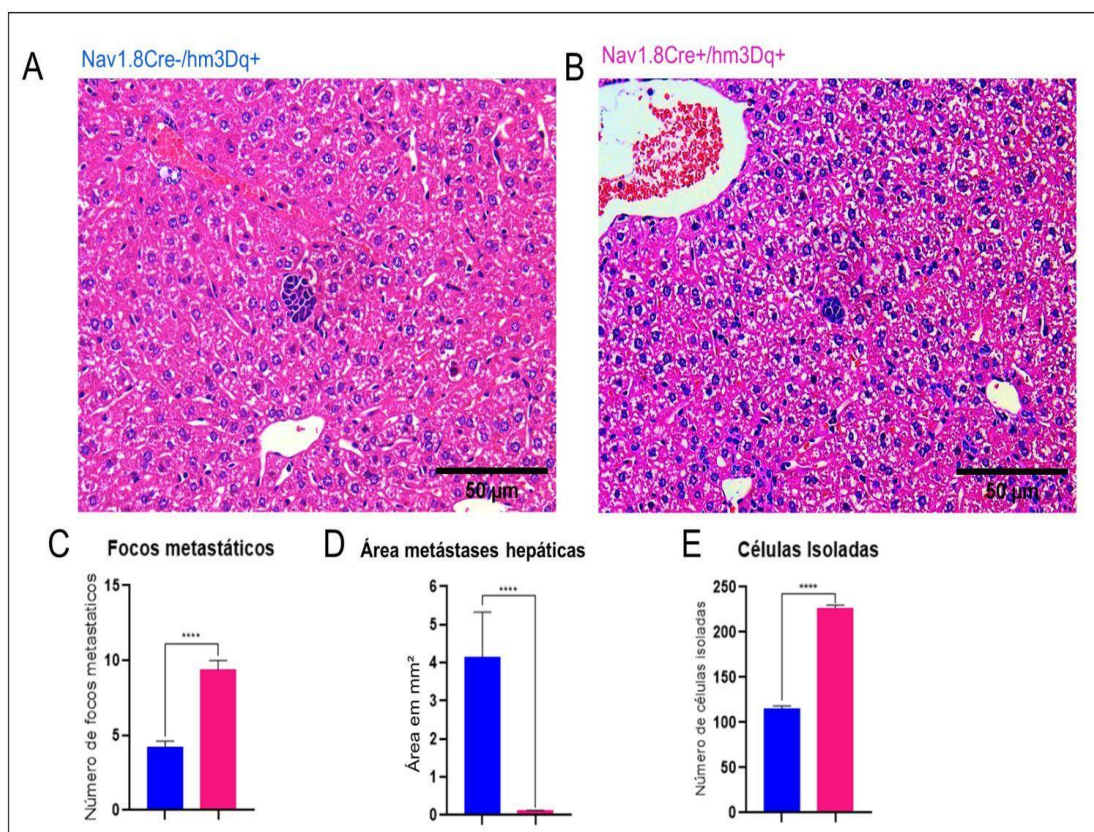


Figura 22: A ativação das fibras nervosas sensoriais altera metástases hepáticas e sugere migração de células tumorais para o pulmão. A e B Fotomicrografia de lâminas de fígado em aumento de 40x, coradas com HE mostrando tecido hepático com metástases. Aumento de

40x. (Barra de escala 50um). **C** Quantificação de número de focos metastáticos hepáticos (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: 2277; Nav1.8-Cre+/hM3Dq 9659), $p=0,0001$. $n=7$. **D** Quantificação da área metastática hepática em mm^2 (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: $4,032 \pm 6,593 \text{ mm}^2$; Nav1.8-Cre+/hM3Dq $1,175 \pm 1,471 \text{ mm}^2$), $p=0,0001$. $n=7$. **E** Quantificação do número de células tumorais isoladas no tecido hepático (Nav1.8-Cre-/hM3Dq: $1111,9 \pm 103,2 \text{ mm}^2$; Nav1.8-Cre+/hM3Dq $3,985 \pm 120,5$), $p=0,0001$. $n=7$. **F e G** Fotomicrografia de lâminas de pulmão em aumento de 40x, coradas com HE mostrando tecido pulmonar com células tumorais.

.

Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais não foram observadas metástases ósseas, pancreáticas, renais, cerebrais, esplênicas e cardíacas

Nos cortes analisados de pâncreas, rins, cérebro, baço e coração não foi observado a formação de sítios metastáticos.

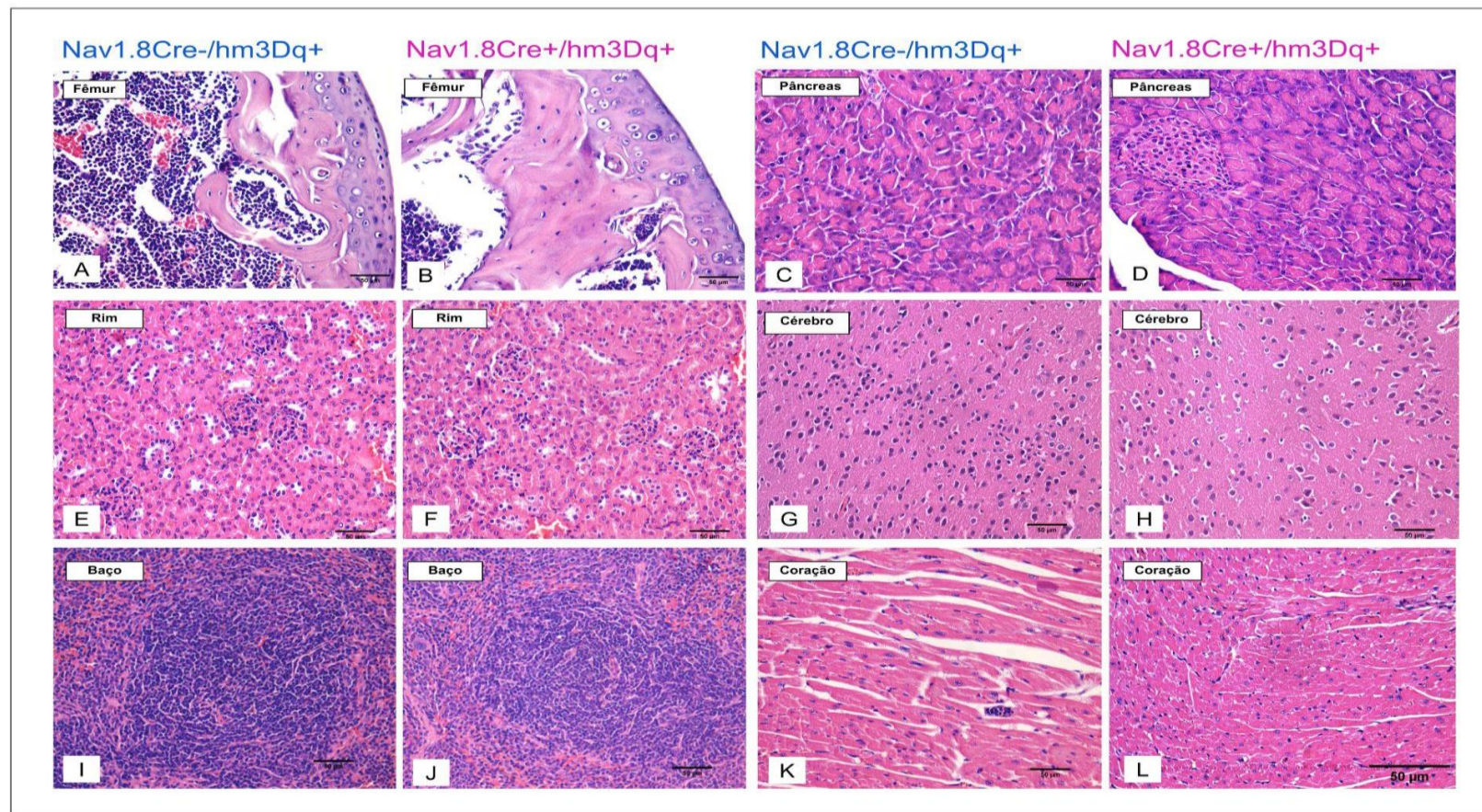


Figura 23: Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais não foram observadas metástases ósseas, pancreáticas, renais, cerebrais, esplênicas e cardíacas por técnica de coloração de Eosina e Hematoxilina. A e B. Fotomicrografia de lâminas de fêmur em aumento de 40x, coradas com HE mostrando tecido ósseo com aspecto característico (Barra de escala 50um). **C e D.** Fotomicrografia de lâminas de pâncreas em aumento de 40x, coradas com HE mostrando tecido ósseo com aspecto característico (Barra de escala 50um). **E e F.** Fotomicrografia de lâminas de rim em aumento de 40x, coradas com HE mostrando tecido ósseo com aspecto característico (Barra de escala 50um). **G e H.** Fotomicrografia de lâminas de cérebro em aumento de 40x, coradas com HE mostrando tecido ósseo com aspecto característico (Barra de escala 50um). **I e J.** Fotomicrografia de lâminas de baço em aumento de 40x, coradas com HE mostrando tecido ósseo com aspecto característico (Barra de escala 50um). **K e L.** Fotomicrografia de lâminas de coração em aumento de 40x, coradas com HE mostrando tecido ósseo com aspecto característico. (Barra de escala 50um).

Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) nos tumores primários E0771 aos 21 e 28 dias, 6 horas após a injeção

Para analisar a formação de metástases os animais foram radiomarcados com o complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina (7-14) e colocados em câmara gama para avaliar a biodistribuição do complexo peptídico. Nos dias 21 e 28 após a inoculação das células E0771, tanto no grupo de camundongos que tiveram as fibras nervosas sensoriais ativadas (E 21 dias e K 28 dias), como no grupo que não teve as fibras ativadas (C 21 dias e I 28 dias) bem como no grupo de camundongos controle sem tumor (A e G), é possível observar que no tempo zero a biodistribuição é bastante inespecífica. Seis horas após a injeção é possível observar uma biodistribuição mais específica na região do tumor, tanto no grupo com as fibras nervosas sensoriais ativadas (F 21 dias e L 28 dias) como no grupo sem a ativação dos nervos sensoriais (D 21 dias e J 28 dias). No grupo controle sem tumor (A, B, C e J) é possível observar uma intensa captação nas regiões de rins e intestino, isso ocorre devido a bombesina, droga utilizada como carreador, possui afinidade por esses órgãos.

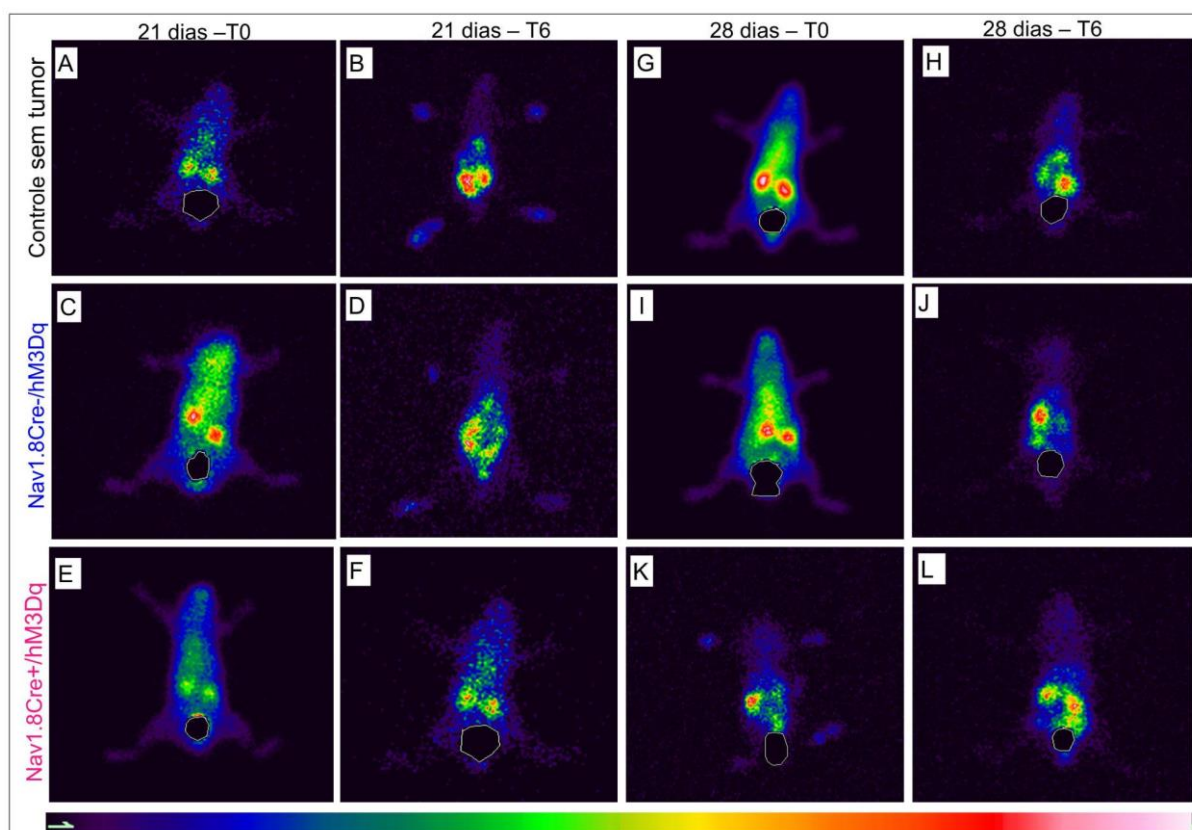


Figura 24: Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) nos tumores primários E0771 aos 21 e 28 dias, 6 horas após a injeção A, B, G e H Imagem da captação da radiação gama

às 0 e 6 horas, respectivamente em animal saudável sem tumor após a administração do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14). **C e D** A aquisição de imagens da captação da radiação gama realizada às 0 e 6 horas no animal controle Nav1.8-Cre-/hM3Dq com tumor E0771 no 21º dia de crescimento, após a administração do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14). **E e F** A aquisição de imagens da captação da radiação gama realizada às 0 e 6 horas no animal com inervação sensorial super ativada Nav1.8-Cre-/hM3Dq com tumor E0771 no 21º dia de crescimento, após a administração do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14).

Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico 99mTc-HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) em vários órgãos distantes do sítio primário - análise ex vivo

Para a análise ex vivo dos órgãos, os camundongos foram eutanasiados, os órgãos foram retirados Figura 25 (A e C) e colocados novamente na câmara gama dispostos conforme Figura 25 (B e D). Em ambos os grupos é possível visualizar uma captura intensa em rins e intestino, isso ocorre devido a bombesina ser metabolizada por esses órgãos. Contudo é possível observar a captura nos tumores, reforçando que células de tumor de mama murino E0771 apresentam receptores de gastrina. Além disso, é possível observar em ambos os grupos (Nava1.8Cre+hM3D e Nava1.8Cre-hM3Dq) uma captação intensa no fígado, corroborando com os achados da histopatologia onde foram encontradas metástases e uma captação mais discreta do baço, pâncreas e pulmão, sugerindo que talvez tenha a disseminação de células tumorais para esses órgãos.

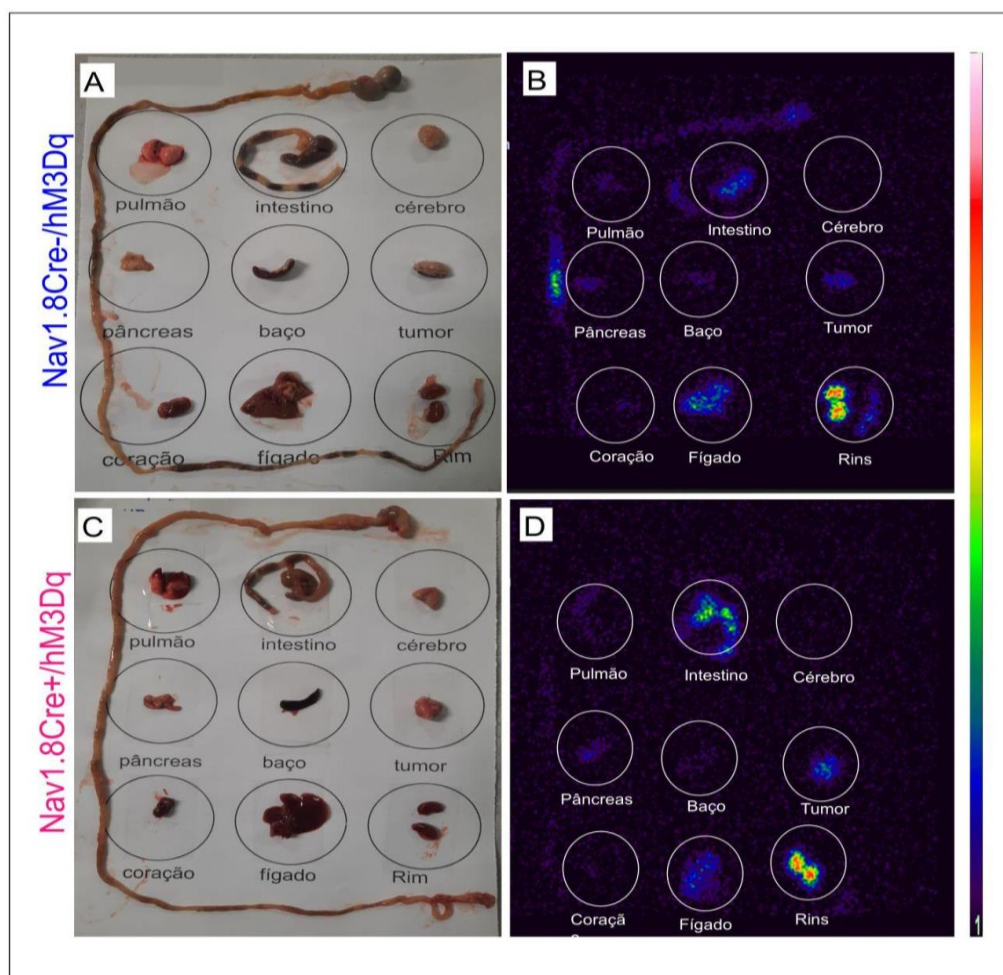


Figura 25: Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico 99mTc-HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) em vários órgãos distantes do

sítio primário - análise ex vivo. A Imagem dos órgão dos camundongos controle Nav1.8Cre-/hM3Dq ex vivo colocados separadamente. **B** Imagem da captação da radiação gama dos respectivos órgãos dos camundongos controle Nav1.8Cre-/hM3Dq da imagem A. **C** Imagem dos órgão dos camundongos com inervação sensorial super estimulada Nav1.8Cre+/hM3Dq, ex vivo colocados separadamente. **D** Imagem da captação da radiação gama dos respectivos órgãos dos camundongos com inervação sensorial super estimulada Nav1.8Cre+/hM3Dq da imagem C.

Independente da ativação das fibras nervosas sensoriais há biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) em vários órgãos distantes do sítio primário

Além da análise qualitativa de cada órgão, foi realizada a análise quantitativa, dessa forma foi possível quantificar a % de radiação presente em cada órgão. Mesmo que não tenha sido observado diferença estatística entre os grupos para nenhum dos órgãos, contudo é possível observar que no fígado tem uma captação mais intensa no grupo superativado (Nav1.8Cre+/hM3Dq) em relação ao grupo sem a ativação das fibras nervosas sensoriais (Nav1.8Cre-/hM3Dq), essa captação nesses órgãos pode ser um indicativo da presença de células tumorais. No intestino e rins é normal haver captação, dado que a bombesina é metabolizada por esses órgãos.

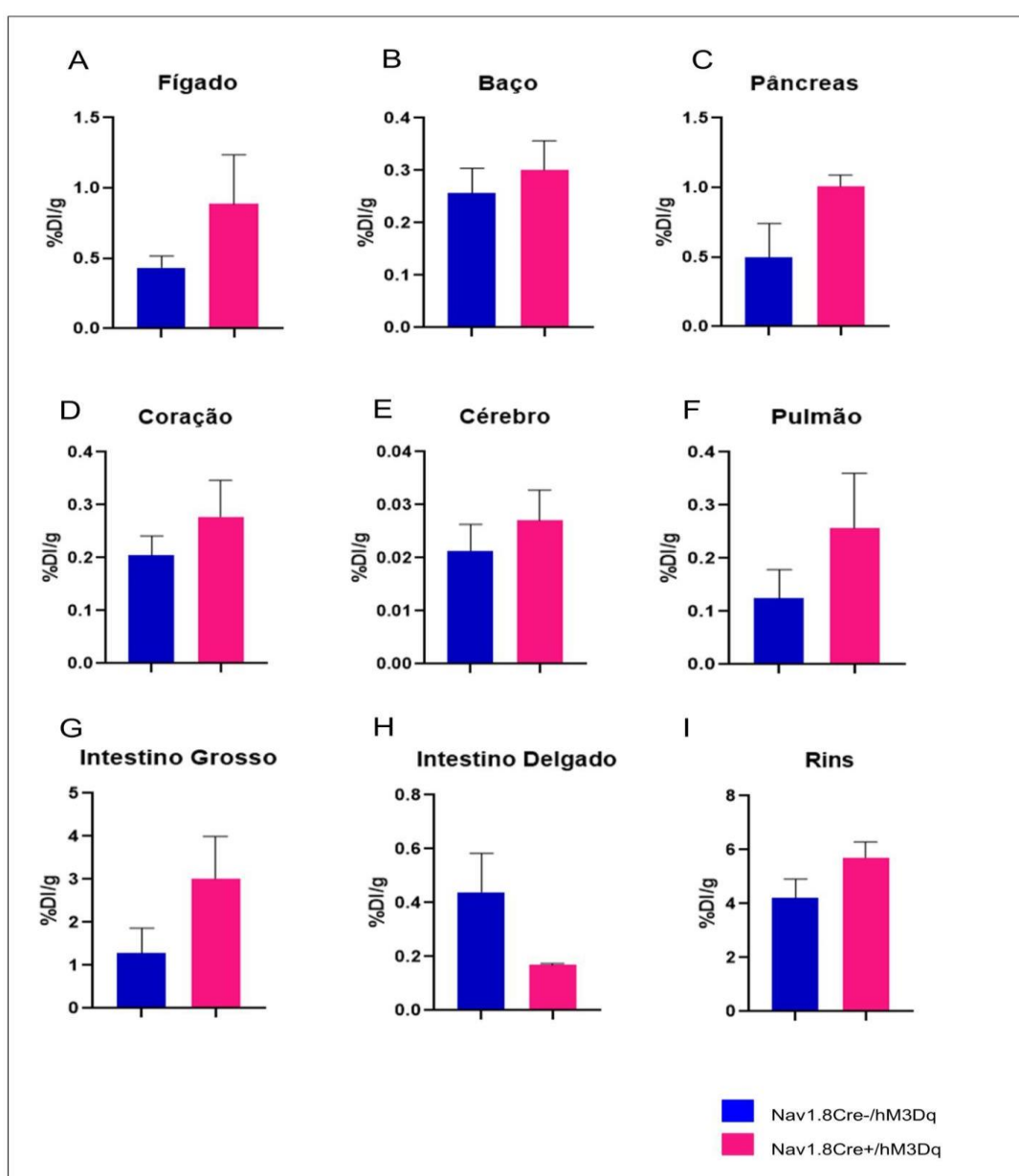


Figura27: Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), *ex vivo*, em camundongos fêmeas Nav1.8Cre+/hM3Dq e Nav1.8Cre-/hM3Dq com tumor de mama E0771 aos 28 dias. **A** Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), % da dose injetada por grama de tecido hepático (Nav1.8Cre-/hM3Dq $0,4503 \pm 0,5509\%$; Nav1.8Cre+/hM3Dq $0,3606 \pm 1,452\%$). **B** Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), % da dose injetada por grama de tecido esplênico (Nav1.8Cre-/hM3Dq $0,0440 \pm 0,1581\%$; Nav1.8Cre+/hM3Dq $0,0727 \pm 0,2461\%$). **C** Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), % da dose injetada por grama de tecido pancreático (Nav1.8Cre-/hM3Dq $0,5083 \pm 0,1916\%$; Nav1.8Cre+/hM3Dq $0,2521 \pm 1,208\%$). **D** Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), % da dose injetada por grama de tecido cardíaco (Nav1.8Cre-/hM3Dq $0,0726 \pm 0,1418\%$; Nav1.8Cre+/hM3Dq $0,0772 \pm 0,2871\%$). **E** Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), % da dose injetada por grama de tecido cerebral (Nav1.8Cre-/hM3Dq $0,0056 \pm 0,0155\%$; Nav1.8Cre+/hM3Dq $0,0076 \pm 0,0268\%$). **F** Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), % da dose injetada por grama de tecido pulmonar (Nav1.8Cre-/hM3Dq $0,1327 \pm 0,1912\%$; Nav1.8Cre+/hM3Dq $0,1166 \pm 0,4565\%$). **G** Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), % da dose injetada por grama de tecido do intestino grosso (Nav1.8Cre-/hM3Dq $1,735 \pm 1,439\%$; Nav1.8Cre+/hM3Dq $1,143 \pm 4,909\%$). **H** Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), % da dose injetada por grama de tecido do intestino delgado (Nav1.8Cre-/hM3Dq $0,2703 \pm 0,6682\%$; Nav1.8Cre+/hM3Dq $0,1433 \pm 0,1275\%$). **I** Biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14), % da dose injetada por grama de tecido renal (Nav1.8Cre-/hM3Dq $1,505 \pm 1,038\%$; Nav1.8Cre+/hM3Dq $0,9159 \pm 4,048\%$).

7. DISCUSSÃO

Anteriormente nosso grupo já havia demonstrado a presença de neurônios sensoriais Nav1.8⁺ no microambiente de tumores murinos E0771.

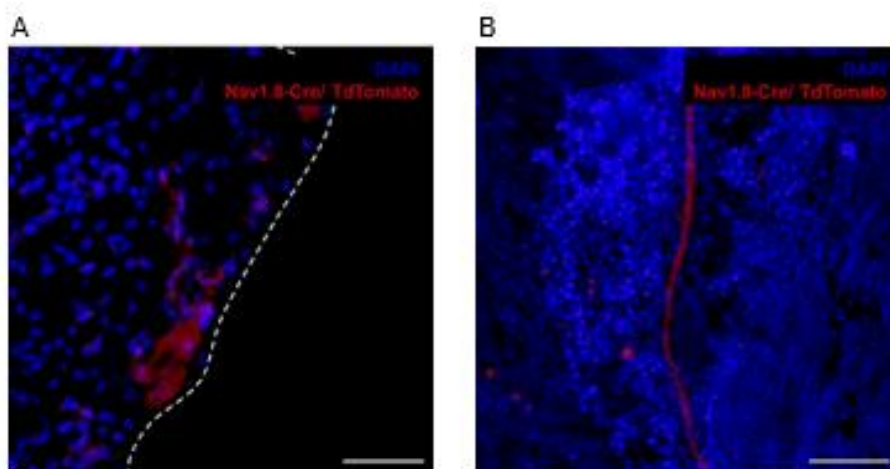


Figura 28: Imagem, por microscopia confocal, mostrando a inervação sensorial em fluorescência vermelha em tumores primários E0771 no 28º dia após a inoculação ototópica de células E0771. Imagens com aumento de 40x. Barras de escala, 50 µm (dados do nosso grupo ainda não publicados).

No estudo anterior mostramos que a ablação de fibras nervosas sensoriais altera o desenvolvimento do tumor E0771. Nossos achados revelaram que a denervação sensorial reduz o crescimento tumoral, a formação de vasos sanguíneos e a proliferação celular nesse microambiente. Além disso, foi observado a alteração nas expressões de marcadores de TEM, bem como na disseminação metastática (dados ainda não publicados).

Mesmo já tendo realizado alguns estudos utilizando células E0771, ainda não havíamos realizado a caracterização desse tipo de tumor, sendo assim, nosso primeiro passo foi caracterizá-lo dado que a literatura era um tanto divergente quanto a classificação entre luminal B (Le Naour et al., 2020 ou triplo negativo (Johnstone CN et al., 2015, Liu J et al., 2016, Bernard MM et al., 2017 e Contreras-Zárate et al., 2019). Os resultados derivados de nossas análises coincidem parcialmente com as conclusões de outros autores que caracterizam tumores E0771 como triplo negativo, dado que observamos que as células E0771 não apresentam receptores de estrógeno e progesterona, contudo, ainda seria importante avaliar os marcadores para HER2.

Sabendo que os tumores E0771 não apresentam receptores hormonais (estrógeno e progesterona), propomos analisar os efeitos da ativação dos nervos sensoriais Nav1.8 sobre esses mesmos tumores mamários. Buscamos avaliar o impacto dessa ativação sobre o

crescimento tumoral. Para isso, foi utilizando o modelo Nav1.8Cre+/hM3Dq e CNO para realizar a ativação das fibras nervosas sensoriais como já havíamos realizado em Costa e colaboradores em 2022. Foi adicionado a este estudo, testes comportamentais no 14º e 27º dias de experimento, a fim de validar que as fibras nervosas foram estimuladas em todo o decorrer do experimento. Observamos que independente do dia o grupo controle possui menor sensibilidade em relação ao grupo super estimulado, mostrando dessa maneira, a eficácia do CNO em ativar as fibras nervosas sensoriais.

Sendo assim, constatamos que os animais nos quais a inervação sensorial foi estimulada (Nav1.8Cre+/hM3Dq) pelo CNO apresentaram um aumento significativo no volume tumoral em comparação com os animais cujas fibras nervosas sensoriais não foram ativadas. Além disso, no grupo superestimulado, foi observada uma proliferação celular mais intensa, uma maior expressão de N-caderina e Fibronectina, bem como, maior expressão de fibras colágenas do tipo I tanto intra quanto peri tumoral (pseudocápsula). Por outro lado, no grupo controle, verificamos uma menor proliferação celular e uma maior expressão do marcador de células epiteliais (E-caderina). Não foram identificadas alterações na vascularização intratumoral entre os grupos.

Este estudo também abordou a formação de sítios metastáticos após a ativação das fibras nervosas sensoriais. Observamos metástases nos pulmões e no fígado. Notavelmente, as metástases hepáticas apresentaram uma área maior no grupo controle em comparação com o grupo superestimulado. No entanto, o grupo superestimulado exibiu uma quantidade maior de focos metastáticos e de células isoladas em comparação com o grupo controle.

O microambiente tumoral da mama é complexo e bastante heterogêneo, composto não apenas pelas células cancerosas, mas também por células imunes, fibroblastos, adipócitos, vasos sanguíneos, componentes da matriz extracelular e fatores secretados por todos esses elementos (Anderson et al 2020). Além desses grupos celulares, autores como Huang e colaboradores em 2014; Zahalka & Frenette em 2020, descrevem a presença de fibras nervosas sensoriais dentro dos tumores.

Estudos utilizando modelos murinos como dos autores Austin e colaboradores em 2017 e Gautron e colaboradores em 2011, mostraram a expressão elevada de PGP9.5 e CGRP (marcadores de fibras nervosas Nav1.8) em tumores mamários, quando comparados ao tecido mamário normal. Pundavela e colaboradores em 2015, descreveram a distribuição de fibras nervosas sensoriais em tumores mamários humanos, interagindo tanto com células cancerosas como com demais células do microambiente.

Fibras nervosas foram observadas como parte do microambiente tumoral em outros tipos de tumores, como: em tumores de próstata (Ayala, et al, 2008; Magnon et al, 2013), cólon e reto (Albo et al, 2011), cabeça e pescoço (Raju et al, 2017), pâncreas (Partecke et al, 2016), estômago (Zhao et al, 2014) e pulmão (Shao et al, 2016). Nosso grupo mostrou anteriormente a presença de fibras nervosas sensoriais em modelo murino usando células B16F10, 16 dias após a inoculação das células (Costa et al., 2022).

Austin e Gautron e seus colaboradores em seus estudos, 2017 e 2011, respectivamente, fizeram relação com a expressão aumentada de fibras nervosas sensoriais e densidade de microvasos e expressão de VEGF, fator importante para a angiogênese tumoral, já que pode ser expresso em terminais nervosos sensoriais. No nosso estudo anterior onde foi depletado as fibras nervosas sensoriais dos tumores de mama E0771(dados ainda não publicados), as áreas dos microvasos intratumorais apareceram diminuídas, enquanto neste nosso estudo com ativação de fibras nervosas sensoriais não observamos mudanças na expressão de microvasos entre os grupos controle e super ativado, isso pode ser em decorrência do tempo (em horas) da ativação dessas fibras sensoriais, já que a ação do CNO cai drasticamente após duas horas da injeção, como demonstrado por Guettier e colaboradores em 2009, enquanto, quando foi realizado a depleção com resiniferotoxina (RTX), essas fibras perderam completamente a sua atividade.

A forma como as células interagem entre si no microambiente tumoral determina o desenvolvimento tumoral e suas características (Hanahan et al., 2011). Dentre as mais variadas células que compõem esse microambiente, as fibras nervosas sensoriais ainda não têm seu papel completamente elucidado quanto a sua participação na progressão da doença. Erim e colaboradores em 2022, usando o modelo de câncer de mama triplo negativo 4T1, demonstraram que ativando as fibras nervosas sensoriais com Olvanil (agonista vaniloide mais potente que a capsaicina), não alterou o volume tumoral, contudo suprimiu metástases hepáticas e pulmonares.

No âmbito da nossa pesquisa, ao estimular as fibras nervosas sensoriais com CNO, foi notada uma modificação no volume dos tumores. O grupo superestimulado apresentou um volume tumoral significativamente maior em comparação ao grupo controle. Durante os primeiros 21 dias, ambos os grupos exibiram comportamento semelhante; contudo, no 22º dia, observamos picos de crescimento nos tumores do grupo superestimulado em relação ao grupo controle. Estes resultados são congruentes com descobertas prévias (ainda não publicadas), nas quais a depleção da inervação sensorial utilizando RTX resultou em um volume tumoral menor no grupo tratado em comparação ao controle, em tumores de mama murinos E0771, contudo

esses resultados vão em contrapartida aos resultados de Erim e colaboradores publicados em 2022, que não observou diferença no volume tumoral após estimular os nervos sensoriais de camundongos em um modelo de câncer 4T1.

Intimamente relacionado ao tamanho do tumor, está o processo de proliferação celular. Neste estudo, notamos uma correlação entre o aumento do volume tumoral, especialmente no grupo superestimulado, e uma expressão elevada de marcadores de proliferação celular em comparação ao grupo controle. Esses resultados coincidem com observações anteriores, onde a depleção resultava em volumes tumorais menores e uma menor taxa de proliferação celular (dados ainda não publicados), assim como observamos em Prazeres e colaboradores em 2020 e Costa e colaboradores em 2022, ambos utilizando o modelo de melanoma murino B16F10. Em síntese, observasse uma relação direta entre o crescimento tumoral e a atividade proliferativa das células, como evidenciado tanto no aumento quanto na redução do volume tumoral e a atividade das fibras nervosas sensoriais no microambiente tumoral. Assim como Wang e colaboradores em 2020 relataram anteriormente que a expressão de NGF (fator de crescimento nervoso) estimula a proliferação e sobrevivência de células tumorais através da ativação constitutiva das vias PI3K-Akt e ERK/p38 MAP quinase (MAPK).

A compreensão das interações entre as células e o microambiente tumoral é fundamental para desvendar os mecanismos pelos quais os tumores se tornam tão agressivos, sendo assim, certas proteínas desempenham um papel crucial na determinação de fenótipos mais ou menos agressivos, notadamente aquelas expressas no citoesqueleto celular, relacionadas à adesão. Exemplos dessas proteínas incluem as caderinas, fibronectina e vimentina, as quais desempenham um papel significativo nos eventos de transição epitélio-mesenquimal no contexto do câncer (Gould, *et al*, 2006; Herzig, *et al.*, 2007).

Essas proteínas não apenas afetam a aderência entre as células, mas também desempenham um papel fundamental nos processos biológicos subjacentes à agressividade tumoral. O entendimento desses mecanismos pode fornecer esclarecimentos valiosos para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas direcionadas e estratégias de prevenção.

Nos tumores quando ocorre essa transdiferenciação, ou seja, as células epiteliais mudam suas características passando a expressar um perfil mais mesenquimal, a célula tumoral muda seus aspectos, perdendo suas características como junções, polaridade, ganham capacidade de migrar e invadir tecidos, resistir a apoptose e adquirem perfil com propriedades de células tronco capazes de escapar da ação de células imunes com capacidade de quimiorresistência (Tryndyak *et al.*, 2010; Kaszak *et al*, 2020; Park *et al*, 2022).

Neste estudo avaliamos quatro marcadores de TEM, observamos que no grupo super estimulado (Nav1.8Cre+hM3Dq+) há uma maior expressão de células de marcadores mesenquimais, N-caderina e Fibronectina, enquanto no grupo controle há uma maior expressão de marcadores epiteliais, E-caderina. A expressão de vimentina foi parecida entre os dois grupos.

Em tumores mamários a diminuição da expressão de E-caderina está associada a um fator crucial na progressão e desenvolvimento de metástases, estando associada a um prognóstico ruim (Gould, *et al*, 2006; Herzig, *et al.*, 2007). Em contrapartida, o aumento da expressão de N-caderina induz a TEM e características semelhantes às células tronco cancerígenas (Loh et al, 2019). A superexpressão de N-caderina está relacionada a tumores mamários invasivos e metastáticos, malignidades manifestadas por transformação celular, menores taxas de apoptose, angiogênese, invasão e metástase (Kaszak et al, 2020). Já a expressão de fibronectina foi relacionada a estágios tardios da metástase e está associada a um pior prognóstico (Lin et al., 2019).

Também avaliamos células co-expressando os dois marcadores ao mesmo tempo, dado que Dongre & Weinberg em 2019 relataram que células tumorais podem não avançar para um estado totalmente mesenquimal, geralmente prosseguem para um estado parcialmente epitelial e parcialmente mesenquimal, dessa forma expressam uma mistura de marcadores. Sendo assim, a TEM é caracterizada por apresentar células em vários estados celulares, dispostas ao longo do espectro epitelial mesenquimal. Contudo, não foi observado significância estatística entre os grupos de células co-expressando E-caderina e N-caderina.

Essa diferença nas expressões desses marcadores pode ser uma justificativa para outros achados do nosso estudo; os sítios metastáticos. Avaliamos através de coloração de eosina e hematoxilina diferentes órgãos e tecidos, como: baço, pâncreas, fígado, rins, coração, cérebro, fêmur e pulmão, que poderiam ser potenciais sítios metastáticos para esse modelo de tumor murinho, porém, seria interessante avaliar nesse mesmo modelo um tempo maior para o crescimento tumoral e consequentemente a formação de ninhos metastáticos.

As metástases hepáticas despertaram nossa atenção ao constatararmos que o grupo super estimulado (Nav1.8Cre+hM3Dq+) apresentou um aumento no número de focos metastáticos e de células isoladas. No entanto, é notável que a área metastática seja menor. Parece que, ao estimular as fibras nervosas sensoriais, o microambiente tumoral cria condições mais propícias para a migração celular para o sítio metastático. No entanto, algum mecanismo ativado, possivelmente relacionado ao sistema imune antitumoral, pela estimulação dos nervos sensoriais, impede a rápida proliferação dessas células, limitando o aumento de tamanho e área

da metástase. Em suma, parece que essas metástases hepáticas não conseguem se desenvolver plenamente quando as fibras nervosas sensoriais são superestimuladas.

Esses achados de metástases hepáticas corroboram com os achados de Erin e colaboradores em 2022 que observaram que quando ativaram as fibras nervosas usando Olvanil ocorreu diminuição de metástases hepáticas e pulmonares. Nesse mesmo trabalho os autores reforçam que a estimulação das fibras sensoriais ainda aumentou o recrutamento intratumoral de células TCD8+, aumento de INF- γ e IL 10 e diminuição de IL 6. Aparentemente a diminuição de metástases se dá pela ativação da via neuroimune, dado que a droga utilizada pelo grupo de Erin (2022) não é capaz de ativar células imunes por si só.

Embora as vias de sinalização intracelular que regulam a TEM sejam bem compreendidas, há evidências crescentes de que as propriedades mecânicas e a composição da matriz extracelular também desempenham um papel fundamental na regulação da transição epitélio mesênquima (Scott et al., 2019). A fim de compreender melhor a influência das fibras nervosas sensoriais no tumor sobre o tumor primário e como a ativação das mesmas influenciam nas metástases, realizamos uma coloração de *picrossirius Red* para marcar fibras colágenas tipo I e III. Devido a esses tumores apresentarem uma pseudocápsula foi realizada a mesma análise na porção intratumoral e na porção da pseudocápsula a qual chamamos de região peritumoral. Observamos que na região intratumoral o grupo superestimulado apresentou maior expressão de fibras colágenas do tipo I, ou seja, fibras maduras, e menos expressão de fibras colágenas do tipo III, ou seja, fibras imaturas. O grupo superativado (Nav1.8Cre+hM3Dq+) também apresentou maior quantidade de colágeno total, ou seja, a soma do colágeno I+III.

O colágeno em tumores, especificamente em tumores mamários, sofre alterações significativas na presença de malignidade e desempenham papéis importantes na modulação do comportamento do tumor. Além disso, o colágeno desempenha papel significativo no surgimento de metástases (Garcia et al., 2021).

No estudo conduzido por Kakkad e colaboradores em 2012, foi abordada a presença das fibras colágenas do tipo I em tumores de mama. Os pesquisadores não apenas examinaram a presença dessas fibras, mas também investigaram sua densidade e o impacto desse componente da matriz extracelular na progressão metastática. Os resultados revelaram uma correlação entre a quantidade de colágeno tipo I e a densidade das fibras, associadas a taxas mais elevadas de metástases linfonodais em pacientes do sexo feminino com câncer de mama.

Neste contexto, nossa análise se concentra exclusivamente nas proporções dos colágenos I e III. No entanto, essas análises são suficientes para sugerir que a ativação dos nervos sensoriais pode alterar a expressão das fibras colágenas dentro do tumor. Isso pode estar

relacionado à maior capacidade dos tumores primários em facilitar a migração das células cancerosas para sítios metastáticos.

Na análise da pseudocápsula dos tumores, observamos um padrão semelhante ao intratumoral. O grupo superativado (Nav1.8Cre+hM3Dq+) demonstrou maiores proporções de colágeno do tipo I e menores proporções de colágeno do tipo III, enquanto o grupo controle exibiu o comportamento oposto. Juntos esses resultados indicam uma correlação entre a ativação dos nervos sensoriais e as alterações na composição do colágeno na pseudocápsula do tumor, sugerindo uma influência direta no microambiente tumoral.

Estudos anteriores, onde foram utilizados modelos de indução de metástases, tumores mamários secundários foram encontrados no cérebro, fígado e fêmur após inoculação das células E0771 (Contreras-Zárate *et al.*, 2019; Hiraga *et al.*, 2019). Dessa forma, a capacidade de formação dessas lesões secundárias por essa linhagem celular parece não acontecer de maneira espontânea para todos os tecidos. Diante disso e das descobertas intrigantes relacionadas às metástases, optamos por repetir o experimento com o intuito de avaliar, por meio de uma abordagem diferente, a presença de metástases à distância. Para tal, foi realizada radiomarcagem de um fármaco com afinidade por células tumorais mamárias, resultando na formação de um composto denominado HYNIC- β Ala-Bombesina (7–14) (^{99m}Tc), cujos detalhes estão mais abrangentes no item 5.12.

Administramos esse composto nos animais e realizamos duas imagens *in vivo*, no 21º dia, imediatamente após a administração, e outra seis horas após a administração. Esse procedimento foi repetido *in vivo* no 28º dia após a inoculação de células E0771. No 21º dia, observou-se captação de radiação gama nula após a administração, limitando-se aos rins e à bexiga, possivelmente devido ao metabolismo da droga. Seis horas após a administração do composto peptídico, observou-se captação nos tumores primários, rins e bexiga, sendo que estes dois últimos órgãos foram provavelmente marcados devido ao metabolismo da droga. No 28º dia, ao repetir esse processo, as mesmas captações foram observadas, no entanto, nos tumores, a captação foi visualmente mais intensa.

A biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC-Ala-Bombesina(7-14) nos camundongos com tumor de mama demonstrou um perfil semelhante àquele observado nos animais sadios com relação à eliminação renal. No tempo de zero horas e seis horas após a administração do ^{99m}Tc -HYNIC-Ala-Bombesina(7-14). Vários autores descrevem o percentual de captação do radiotraçador pelo tumor. Faintuche e colaboradores em 2008 encontraram um percentual de captação de 3,0% do ^{99m}Tc -HYNIC-Ala-Bombesina (7-14) pelo tumor de próstata (células PC3), decorridos 90 minutos após a administração do radiofármaco. Já Shi e colaboradores em

2008 descreveram um valor de aproximadamente 1,0% de captação do ^{99m}Tc -HYNIC- Ala-Bombesina(7-14) pelo tumor de cólon (células HT-29), 1 hora após a injeção do composto radiomarcado. Por sua vez, Mansi e colaboradores em 2011 relataram um percentual de captação de 5,5% de um derivado da bombesina marcado com ^{68}Ga pelo tumor de próstata (células LNCaP), após 1 hora da injeção do radiotraçador. Contudo para os tumores de mama E0771 foi necessário esperar seis horas após a administração do composto para ser observada captações pelo tumor, essa demora da captação pelo tumor pode estar relacionada com a vasculatura comprimida desses tumores e não tão abundante, como visto nas imagens de micrografias com marcador de células endoteliais (fator VIII).

Realizamos também uma análise da captação da radiação *ex vivo*, mediante a eutanásia dos animais e a retirada de órgãos como fígado, rins, pâncreas, baço, intestino grosso e delgado, cérebro, coração, pulmão e tumor. Os órgãos e o tumor de cada animal foram dispostos separadamente na câmara gama, a fim de avaliar a presença e captação de radiação em cada um, considerando que *in vivo*, os órgãos se sobrepõem, impossibilitando a visualização da captação em cada órgão.

Identificamos que, além da captação nos tumores, ocorreu captação nos pulmões, fígado, baço, rins e intestino. Considerando que a bombesina é um fármaco metabolizado pelos rins, seguido pela bexiga, e também apresenta algum metabolismo intestinal, inferimos que qualquer captação que não se restrinja a esses órgãos pode indicar a presença de células tumorais.

Além disso, ainda colocamos os órgãos em um contador gama automático para quantificar a porcentagem de radiação em cada órgão. Nessa análise não observamos significância estatística entre os grupos, isso pode ser em decorrência do n experimental ter sido baixo. Observando os gráficos da quantificação, em todos os órgãos exceto intestino delgado, aparece maior captação para o grupo superestimulado, portanto, o ideal seria repetir o experimento com um n experimental maior.

A relação das fibras nervosas sensoriais e os seus efeitos sobre os diferentes tumores ainda são pouco explorados. As evidências do papel dos neurotransmissores no desenvolvimento de metástases têm-se destacado. Balood e colaboradores em 2022, mostraram como o CGRP interfere na agressividade de tumores melanoma B16F10. Em 2003 Drell e seus colaboradores já falavam sobre a substância P, secretada por neurônios sensoriais, poderia estar envolvidos na estimulação da migração de células tumorais, etapa fundamental da cascata metastática, assim como Muñoz e colaboradores em 2010; Mehboob e colaboradores em 2021 e Li e colaboradores em 2013, demonstraram que a substância P secretada por fibras nervosas

sensoriais promove aumento de metástases, mitogênese, proliferação, inflamação e angiogênese.

Embora os resultados ofereçam *insights* bastante promissores, translacionar esses achados para a aplicação clínica requer mais investigações experimentais. A inervação sensorial pode ser uma possibilidade não apenas como um biomarcador, mas também como um possível alvo terapêutico para o tratamento do câncer de mama, contudo demanda avaliações mais aprofundadas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nossos resultados obtidos até o momento sugerem que os tumores mamários murinos E0771 não apresentam receptores de estrogênio nem de progesterona.

Assim como, a modulação quimiogénética dos nervos sensoriais de tumores mamários murinos E0771, apresentaram maior volume tumoral, maiores taxas de proliferação, de transição epitélio mesênquima além de expressarem uma maior porcentagem de fibras colágenas do tipo I. Além disso, modular a atividade nervosa sensorial interfere diretamente na formação de sítios metastáticos hepáticos.

Não consta nos resultados apresentados, contudo já foi realizada a técnica adicional de citometria de fluxo, para analisar o recrutamento de células imunes intratumorais após a modulação quimiogénética.

Dada a complexidade da natureza do microambiente tumoral e os resultados obtidos até agora, são pertinentes de algumas avaliações adicionais como: avaliar o comportamento do tumor em diferentes momentos do desenvolvimento, bem como o comportamento do microambiente tumoral mediante a inibição da atividade das fibras nervosas sensoriais.

9 REFERÊNCIAS

- Abdul M, McCray SD, Hoosein NM. Expression of gamma-aminobutyric acid receptor (subtype A) in prostate cancer. *Acta Oncol.* 2008;47:1546–50.
- ABDUL, Mansoor; HOOSEIN, Naseema. Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity. **Anticancer research**, v. 22, n. 3, p. 1727-1730, 2002.
- Abiatari, I. et al. Consensus transcriptome signature of perineural invasion in pancreatic carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1494–1504 (2009).
- Albo, D. et al. Neurogenesis in colorectal cancer is a marker of aggressive tumor behavior and poor outcomes. *Cancer* 117, 4834–4845 (2011).
- ALEXANDER, Georgia M. et al. Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. **Neuron**, v. 63, n. 1, p. 27-39, 2009.
- Amit, M., Na'ara, S. & Gil, Z. Mechanisms of cancer spread along nerves. *Nat. Rev. Câncer* 16, 399–408 (2016).
- ANDERSON, Nicole M.; SIMON, M. Celeste. The tumor microenvironment. **Current Biology**, v. 30, n. 16, p. R921-R925, 2020.
- AUMAILLEY, Monique. The laminin family. **Cell adhesion & migration**, v. 7, n. 1, p. 48-55, 2013.
- Ayala, G. E. et al. Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 7593–7603 (2008).
- AYALA, G. E.; DAI, H.; POWELL, M.; LI, R. *et al.* Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. **Clin Cancer Res**, 14, n. 23, p. 7593-7603, Dec 1 2008.
- BALOOD, Mohammad et al. Nociceptor neurons affect cancer immunosurveillance. **Nature**, v. 611, n. 7935, p. 405-412, 2022.
- BARCUS, Craig E.; LONGMORE, Gregory D. Collagen linearization within tumors. **Cancer research**, v. 81, n. 22, p. 5611-5612, 2021.
- Bergeret M, Khrestchatisky M, Tremblay E, Bernard A, Gregoire A, Chany C. GABA modulates cytotoxicity of immunocompetent cells expressing GABAA receptor subunits. *Biomed Pharmacother.* 1998;52:214–9.
- BERNARD MM , MCCONNERY JR , HOSKIN DW. Gingerol, um dos principais constituintes fenólicos da raiz de gengibre, induz a parada do ciclo celular e a apoptose em células de câncer de mama triplo negativo . *Exp Mol Pathol* . 2017

Bhat R, Thangavel H, Abdulkareem NM, Vasaikar S, De Angelis C, Bae L, Cataldo ML, Nanda S, Fu X, Zhang B, Schiff R and Trivedi MV (2022) NPY1R exerts inhibitory action on estradiol-stimulated growth and predicts endocrine sensitivity and better survival in ER-positive breast cancer. *Sci Rep* 12:1972. doi: 10.1038/s41598-022-05949-7

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

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW and Tracey KJ (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405:458-62. doi: 10.1038/35013070

CARLESSO, F. N. et al. Evaluation of 99m Tc-HYNIC-βAla-Bombesin (7-14) as an agent for pancreas tumor detection in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 923-928, 2015.

CATTERALL, William A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 8, p. a003947, 2011.

Chatterjee, D. et al. A invasão perineural e intraneural em amostras de pancreaticoduodenectomia pós-terapia prediz mau prognóstico em pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático. *Sou. J. Surg. Patol.* 36 , 409–417 (2012).

Chen O, Donnelly CR and Ji RR (2020) Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. *Curr Opin Neurobiol* 62:17-25. doi: 10.1016/j.conb.2019.11.006

CHEN, Zhilong; FANG, Zheng; MA, Ji. Regulatory mechanisms and clinical significance of vimentin in breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 111068, 2021.

Cheng Y, Tang XY, Li YX, Zhao DD, Cao QH, Wu HX, Yang HB, Hao K and Yang Y (2019) Depression-Induced Neuropeptide Y Secretion Promotes Prostate Cancer Growth by Recruiting Myeloid Cells. *Clin Cancer Res* 25:2621-2632. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-18-2912

Chida, Y., Hamer, M., Wardle, J. & Steptoe, A. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5, 466–475 (2008).

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

Cohen JA, Edwards TN, Liu AW, Hirai T, Jones MR, Wu J, Li Y, Zhang S, Ho J, Davis BM, Albers KM and Kaplan DH (2019) Cutaneous TRPV1(+) Neurons Trigger Protective Innate Type 17 Anticipatory Immunity. *Cell* 178:919-932.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.022

CONTRERAS-ZÁRATE MJ , DAY NL , ORMOND DR , et al. O estradiol induz a sinalização de BDNF/TrkB no câncer de mama triplo negativo para promover metástases cerebrais . *Oncogene* . 2019

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

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

DE AZUA, Inigo Ruiz et al. Novel insights into the function of β -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 22, n. 2, p. 74-80, 2011.

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

DE CASTRO SANTOS, Ana Luíza et al. Oral formulation of Wnt inhibitor complex reduces inflammation and fibrosis in intraperitoneal implants in vivo. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 13, n. 5, p. 1420-1435, 2023.

DE LERA RUIZ, Manuel; KRAUS, Richard L. Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 18, p. 7093-7118, 2015.

De Oliveira, T. et al. Syndecan-2 promotes perineural invasion and cooperates with K-ras to induce an invasive pancreatic cancer cell phenotype. *Mol. Cancer* 11, 19 (2012).

DISS, James KJ et al. Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel α -subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. **The Prostate**, v. 48, n. 3, p. 165-178, 2001.

Dollé L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V and Hondermarck H (2003) Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 22:5592-5601. doi: 10.1038/sj.onc.1206805

DONGRE, Anushka; WEINBERG, Robert A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 2, p. 69-84, 2019.

ERIN, Nuray et al. Olvanil activates sensory nerve fibers, increases T cell response and decreases metastasis of breast carcinoma. **Life Sciences**, v. 291, p. 120305, 2022.

ERIN, Nuray et al. Vagotomy enhances experimental metastases of 4THMpc breast cancer cells and alters substance P level. **Regulatory peptides**, v. 151, n. 1-3, p. 35-42, 2008.

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

FRIED, David E. *et al.* Ammonia modifies enteric neuromuscular transmission through glial γ -aminobutyric acid signaling. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 313, n. 6, p. G570-G580, 2017.

GARCIA, Ana PV *et al.* Canine mammary cancer tumour behaviour and patient survival time are associated with collagen fibre characteristics. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 5668, 2021.

GARNER, Hannah; DE VISSER, Karin E. Immune crosstalk in cancer progression and metastatic spread: a complex conversation. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 8, p. 483-497, 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.

Gerendai, I. *et al.* Transneuronal labelling of nerve cells in the CNS of female rat from the mammary gland by viral tracing technique. *Neuroscience* 108, 103–118 (2001).

GOMEZ, Juan L. *et al.* Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*, v. 357, n. 6350, p. 503-507, 2017.

GOULD ROTHBERG, B. E.; BRACKEN, M. B. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, 100, n. 2, p. 139-148, Nov 2006.

GRAY, Michael J. *et al.* Phosphatidylserine-targeting antibodies augment the anti-tumorigenic activity of anti-PD-1 therapy by enhancing immune activation and downregulating pro-oncogenic factors induced by T-cell checkpoint inhibition in murine triple-negative breast cancers. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2016.

GU, J. W.; YOUNG, E.; BUSBY, B.; COVINGTON, J. *et al.* Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis, and growth of breast cancer in female mice. **Cancer Biol Ther**, 8, n. 6, p. 514-521, Mar 15 2009.

GUETTIER, Jean-Marc *et al.* A chemical-genetic approach to study G protein regulation of β cell function in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 45, p. 19197-19202, 2009.

Gumireddy K, Li A, Kossenkova AV, Sakurai M, Yan J, Li Y, *et al.* The mRNA-edited form of GABRA3 suppresses GABRA3-mediated Akt activation and breast cancer metastasis. *Nat Commun*. 2016;7:10715.

GUO, Liantao et al. Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy. **Experimental hematology & oncology**, v. 12, n. 1, p. 1-27, 2023.

GUTMAN, George A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 4, p. 473-508, 2005.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, 21, n. 3, p. 309-322, Mar 20 2012.

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

HARBECK, N., PENAULT-LLORCA, F., CORTES, J. *et al.* Câncer de mama. *Nat Rev Dis Primers* 5 , 66 (2019).

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.

Hassan, S. et al. Behavioral stress accelerates prostate cancer development in mice. *J. Clin. Invest.* 123, 874–886 (2013).

Hebb, C. & Linzell, J. L. Innervation of the mammary gland. A histochemical study in the rabbit. *Histochem. J.* 2, 491–505 (1970).

HEDSTROM, Kristian L.; RASBAND, Matthew N. Intrinsic and extrinsic determinants of ion channel localization in neurons. *Journal of neurochemistry*, v. 98, n. 5, p. 1345-1352, 2006.

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

HINSHAW, Dominique C.; SHEVDE, Lalita A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. **Cancer research**, v. 79, n. 18, p. 4557-4566, 2019.

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

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

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

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

Hsieh HY, Shen CH, Lin RI, Feng YM, Huang SY, Wang YH, et al. Cyproheptadine exhibits antitumor activity in urothelial carcinoma cells by targeting GSK3beta to suppress mTOR and beta-catenin signaling pathways. *Cancer Lett*. 2016;370:56–65.

Huang, D. et al. As fibras nervosas nos tecidos do câncer de mama indicam progressão agressiva do tumor. *Medicina* 93 , e172 (2014).

Huang, D. et al. Nerve fibers in breast cancer tissues indicate aggressive tumor progression. *Medicine* 93, e172 (2014).

HUANG, Xiaoshuang et al. Structural basis for high-voltage activation and subtype-specific inhibition of human Nav1. 8. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 30, p. e2208211119, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2022

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. 6 Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/situacao-do-cancer-de-mama-no-brasil-sintese-de-dados-dos-sistemas-de-informacao>. Acesso em: 12 dez 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa de 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/cancer/numeros/estimativa>. Acesso em: 25 nov 2022.

JAIN, Shalini et al. Chronic activation of a designer G q-coupled receptor improves β cell function. *The Journal of clinical investigation*, v. 123, n. 4, p. 1750-1762, 2013.

JAYACHANDRAN, Priya et al. Breast cancer and neurotransmitters: emerging insights on mechanisms and therapeutic directions. **Oncogene**, v. 42, n. 9, p. 627-637, 2023.

JENDRYKA, Martin et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 4522, 2019.

Jiang SH, Zhu LL, Zhang M, Li RK, Yang Q, Yan JY, et al. GABRP regulates chemokine signalling, macrophage recruitment and tumour progression in pancreatic cancer through tuning KCNN4-mediated Ca^{2+} signalling in a GABA-independent manner. *Gut*. 2019.

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

JOHNSTONE CN , SMITH YE , CAO Y , et al. Caracterização funcional e molecular dos tumores EO771.LMB, um novo modelo derivado de camundongo C57BL/6 de câncer de mama metastático espontâneo . *Modelo Dis Mec* . 2015

JOHNSTONE, Cameron N. et al. Functional and molecular characterisation of EO771. LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. **Disease models & mechanisms**, v. 8, n. 3, p. 237-251, 2015.

KAKKAD, Samata M. et al. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. **Journal of biomedical optics**, v. 17, n. 11, p. 116017-116017, 2012.

Kamiya, A. et al. Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression. *Nat. Neurosci.* 22, 1289–1305 (2019).

Kast RE. Glioblastoma chemotherapy adjunct via potent serotonin receptor-7 inhibition using currently marketed high-affinity antipsychotic medicines. *Br J Pharm.* 2010;161:481–7.

KASZAK, Ilona et al. Role of cadherins in cancer—a review. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 20, p. 7624, 2020.

KIM, Mi Young. Breast cancer metastasis. In: **Translational Research in Breast Cancer**. Singapore: Springer Singapore, 2021. p. 183-204.

Köves, K., Györgyi, Z., Szabó, F. & Boldogkői, Z. Characterization of the autonomic innervation of mammary gland in lactating rats studied by retrograde transynaptic virus labeling and immunohistochemistry. *Acta Physiol. Hung.* 99, 148–158 (2012).

Kruger LC, Isom LL. Voltage-Gated Na⁺ Channels: Not Just for Conduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Jun 1;8(6):a029264.

Krüttgen A, Schneider I and Weis JJBp (2006) The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. 16:304-310.

Lang K, Bastian P. Neurotransmitter effects on tumor cells and leukocytes. *Prog Exp Tumor Res.* 2007;39:99–121.

Lang K, Drell TL, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells. *Immunol Lett.* 2003;90:165–72.

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

Le CP, Nowell CJ, Kim-Fuchs C, Botteri E, Hiller JG, Ismail H, et al. Chronic stress in mice remodels lymph vasculature to promote tumour cell dissemination. *Nat Commun.* 2016;7:10634.

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

Le, C. P. et al. Chronic stress in mice remodels lymph vasculature to promote tumour cell dissemination. *Nat. Commun.* 7, 10634 (2016).

LEE, Kyoung Eun et al. Hif1a deletion reveals pro-neoplastic function of B cells in pancreatic neoplasia. **Cancer discovery**, v. 6, n. 3, p. 256-269, 2016.

Li X, Ma G Fau - Ma Q, Ma Q Fau - Li W, Li W Fau - Liu J, Liu J Fau - Han L, Han L Fau - Duan W, Duan W Fau - Xu Q, Xu Q Fau - Liu H, Liu H Fau - Wang Z, Wang Z Fau - Sun Q, Sun Q Fau - Wang F, Wang F Fau - Wu E and Wu E (2013) Neurotransmitter substance P mediates pancreatic cancer perineural invasion via NK-1R in cancer cells.

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

Li, X. et al. Sonic hedgehog paracrine signaling activates stromal cells to promote perineural invasion in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 20, 4326–4338 (2014).

Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J. A., Berger, D. H. & Albo, D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer* 115, 3379–3391 (2009).

Lillberg, K. et al. Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. *Am. J. Epidemiol.* 157, 415–423 (2003).

LIN, Meng-Chieh et al. Transfer of mammary gland-forming ability between mammary basal epithelial cells and mammary luminal cells via extracellular vesicles/exosomes. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 124, p. e55736, 2017.

LIU J , BLAKE SJ , YONG MCR , et al. Eficácia melhorada da neoadjuvante em comparação com a imunoterapia adjuvante para erradicar a doença metastática . *Câncer Descoberta* . 2016.

LOH, Chin-Yap et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1118, 2019.

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

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

Madden KS, Szpunar MJ and Brown EB (2011) β -Adrenergic receptors (β -AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high β -AR-expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 130:747-758. doi: 10.1007/s10549-011-1348-y

Madsen B, Georg B, Madsen MW and Fahrenkrug J (2001) Estradiol down regulates expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor type-1 in breast cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 172:203-11. doi: 10.1016/s0303-7207(00)00341-5

Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ, et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science*. 2013;341:1236361.

Magnon, C. et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science* 341, 1236361 (2013).

Magnon, C. et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science* 341, 1236361 (2013).

MAIMELA, Nomathamsanqa Resegofetse; LIU, Shasha; ZHANG, Yi. Fates of CD8⁺ T cells in tumor microenvironment. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 17, p. 1-13, 2019.

MANCUSI, Rebecca; MONJE, Michelle. The neuroscience of cancer. **Nature**, v. 618, n. 7965, p. 467-479, 2023.

MANFIOLETTI, Guidalberto; FEDELE, Monica. Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) 2021. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5848, 2022.

MANVICH, Daniel F. et al. The DREADD agonist clozapine N-oxide (CNO) is reverse-metabolized to clozapine and produces clozapine-like interoceptive stimulus effects in rats and mice. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 3840, 2018.

Marchesi, F. et al. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 68, 9060–9069 (2008).

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

MARTINEZ, Vena K. et al. Off-target effects of clozapine-N-oxide on the chemosensory reflex are masked by high stress levels. *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 521, 2019.

MCCLAIN, Jonathon L.; FRIED, David E.; GULBRANSEN, Brian D. Agonist-evoked Ca²⁺ signaling in enteric glia drives neural programs that regulate intestinal motility in mice. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, v. 1, n. 6, p. 631-645, 2015.

MCNALLY, Sara; STEIN, Torsten. Overview of mammary gland development: a comparison of mouse and human. **Mammary Gland Development: Methods and Protocols**, p. 1-17, 2017.

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

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

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

Mehboob R, Gilani SA, Hassan A, Sadaf, Tanvir I, Javaid S, Khalid S, Hasan S, Waseem H, Alwazzan A and Munoz M (2021) Prognostic Significance of Substance P/Neurokinin 1 Receptor and Its Association with Hormonal Receptors in Breast Carcinoma. *Biomed Res Int* 2021:5577820. doi: 10.1155/2021/5577820

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

MITTAL, Vivek. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 13, p. 395-412, 2018.

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

Muñoz M, Rosso M Fau - Robles-Frias MJ, Robles-Frias Mj Fau - Salinas-Martín MV, Salinas-Martín Mv Fau - Rosso R, Rosso R Fau - González-Ortega A, González-Ortega A Fau - Coveñas R and Coveñas R (2010) The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist aprepitant on melanoma cell lines.

Nagashima H, Mahlaköiv T, Shih HY, Davis FP, Meylan F, Huang Y, Harrison OJ, Yao C, Mikami Y, Urban JF, Jr., Caron KM, Belkaid Y, Kanno Y, Artis D and O'Shea JJ (2019) Neuropeptide CGRP Limits Group 2 Innate Lymphoid Cell Responses and Constrains Type 2 Inflammation. *Immunity* 51:682-695.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.009

NAKAJIMA, Kenichiro *et al.* Minireview: Novel aspects of M3 muscarinic receptor signaling in pancreatic β -cells. *Molecular endocrinology*, v. 27, n. 8, p. 1208-1216, 2013.

Nakata Y, Miura K, Yamasaki N, Ogata S, Miura S, Hosomi N and Kaminuma O (2022) Expression and Function of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Induced Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci* 23. doi: 10.3390/ijms23031779

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

Nocito A, Dahm F, Jochum W, Jang JH, Georgiev P, Bader M, et al. Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts. *Cancer Res.* 2008;68:5152–8.

NOLAN, Emma; LINDEMAN, Geoffrey J.; VISVADER, Jane E. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. **Cell**, 2023.

ORRANTIA-BORUNDA E, ANCHONDO-NUÑEZ P, ACUÑA-AGUILAR LE, GÓMEZ-VALLES FO, RAMÍREZ-VALDESPINO CA. Subtypes of Breast Cancer. In: Mayrovitz HN. editor. *Breast Cancer*. Brisbane (AU): Exon Publications. Online first 22 Jun 2022.

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

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

PAPAZOGLU, Ioannis et al. A distinct hypothalamus-to- β cell circuit modulates insulin secretion. *Cell Metabolism*, v. 34, n. 2, p. 285-298. e7, 2022.

Park DY, Lee J, Kim J, Kim K, Hong S, Han S, Kubota Y, Augustin HG, Ding L, Kim JW, Kim H, He Y, Adams RH and Koh GY (2017) Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier. *Nat Commun* 8:15296. doi: 10.1038/ncomms15296

PARK, Misung et al. Breast cancer metastasis: Mechanisms and therapeutic implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6806, 2022.

Partecke, L. I. et al. Chronic stress increases experimental pancreatic cancer growth, reduces survival and can be antagonised by beta-adrenergic receptor blockade. *Pancreatology* 16, 423–433 (2016).

Partecke, L. I. et al. Subdiaphragmatic vagotomy promotes tumor growth and reduces survival via TNFalpha in a murine pancreatic cancer model. *Oncotarget* 8, 22501–22512 (2017).

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

PLITAS, George; RUDENSKY, Alexander Y. Regulatory T cells in cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 4, p. 459-477, 2020.

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.

PROVENZANO, Elena; ULANER, Gary A.; CHIN, Suet-Feung. Molecular classification of breast cancer. **PET clinics**, v. 13, n. 3, p. 325-338, 2018.

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

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

Raju, B., Haug, S. R., Ibrahim, S. O. & Heyeraas, K. J. Sympathectomy decreases size and invasiveness of tongue cancer in rats. *Neuroscience* 149, 715–725 (2007).

Ramachandra R, McGrew SY, Baxter JC, Howard JR, Elmslie KS. NaV1.8 channels are expressed in large, as well as small, diameter sensory afferent neurons. *Channels (Austin)*. 2013 Jan 1;7(1):34-7.

RAMACHANDRA, Renuka et al. NaV1. 8 channels are expressed in large, as well as small, diameter sensory afferent neurons. **Channels**, v. 7, n. 1, p. 34-37, 2013.

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

Ravindranathan SA-O, Passang TA-O, Li JA-OX, Wang S, Dhamsania RA-O, Ware MB, Zaidi MY, Zhu J, Cardenas MA-O, Liu YA-O, Gumber S, Robinson B, Sen-Majumdar A, Zhang HA-O, Chandrakasan SA-O, Kissick HA-O, Frey AB, Thomas SA-OX, El-Rayes BF, Lesinski GA-O and Waller EA-O (2022) Targeting vasoactive intestinal peptide-mediated signaling enhances response to immune checkpoint therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma.

Reijmen E, Vannucci L, De Couck M, De Greve J, Gidron Y. Therapeutic potential of the vagus nerve in cancer. *Immunol Lett*. 2018;202:38–43.

Renz BW, Takahashi R, Tanaka T, Macchini M, Hayakawa Y, Dantes Z, Maurer HC, Chen X, Jiang Z, Westphalen CB, Ilmer M, Valenti G, Mohanta SK, Habenicht AJR, Middelhoff M, Chu T, Nagar K, Tailor Y, Casadei R, Di Marco M, Kleespies A, Friedman RA, Remotti H, Reichert M, Worthley DL, Neumann J, Werner J, Iuga AC, Olive KP and Wang TC (2018) β 2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer. *Cancer cell* 33:75-90.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2017.11.007

Renz BW, Takahashi R, Tanaka T, Macchini M, Hayakawa Y, Dantes Z, et al. Beta2 adrenergic-neurotrophin feedforward loop promotes pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 2018;33:75–90 e7.

Renz BW, Tanaka T, Sunagawa M, Takahashi R, Jiang Z, Macchini M, et al. Cholinergic signaling via muscarinic receptors directly and indirectly suppresses pancreatic tumorigenesis and cancer stemness. *Cancer Discov*. 2018;8:1458–73.

RHANA, P. et al. Is there a role for voltage-gated Na⁺ channels in the aggressiveness of breast cancer?. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 50, p. e6011, 2017.

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

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

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

SALOMAN, Jami L. et al. A expressão de Gi-DREADD em nervos periféricos produz analgesia dependente de ligante, bem como alterações funcionais independentes de ligante em neurônios sensoriais. *Journal of Neuroscience*, v. 36, n. 42, pág. 10769-10781, 2016.

SATELLI, Arun; LI, Shulin. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cellular and molecular life sciences**, v. 68, p. 3033-3046, 2011.

Schuller HM. Neurotransmission and cancer: implications for prevention and therapy. *Anticancer drugs*. 2008;19:655–71.

Schuller HM. Regulatory role of G protein-coupled receptors in pancreatic cancer development and progression. *Curr Med Chem*. 2018;25:2566–75.

SCOTT, Lewis E.; WEINBERG, Seth H.; LEMMON, Christopher A. Mechanochemical signaling of the extracellular matrix in epithelial-mesenchymal transition. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, p. 135, 2019.

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

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

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

Shao, J. X. et al. Autonomic nervous infiltration positively correlates with pathological risk grading and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Thorac. Cancer* 7, 588–598 (2016).

Shapovalov Y, Zettel M, Spielman SC, Amico-Ruvio SA, Kelly EA, Sipe GO, et al. Fluoxetine modulates breast cancer metastasis to the brain in a murine model. *BMC Cancer*. 2014;14:598.

SHARONOV, George V. et al. B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 5, p. 294-307, 2020.

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

Silverman DA, Martinez VK, Dougherty PM, Myers JN, Calin GA and Amit M (2021) Cancer-Associated Neurogenesis and Nerve-Cancer Cross-talk. *Cancer Res* 81:1431-1440. doi: 10.1158/0008-5472.Can-20-2793

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

SINGH, Purva; CARRAHER, Cara; SCHWARZBAUER, Jean E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 26, p. 397-419, 2010.

SMITH, Paul et al. Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. **FEBS letters**, v. 423, n. 1, p. 19-24, 1998.

SOBIERAJSKA, Katarzyna et al. Endothelial cells in the tumor microenvironment. **Tumor Microenvironment: Non-Hematopoietic Cells**, p. 71-86, 2020.

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

Sood AK, Armaiz-Pena GN, Halder J, Nick AM, Stone RL, Hu W, et al. Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. *J Clin Invest*. 2010;120:1515–23.

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

Stanke, M. et al. Target-dependent specification of the neurotransmitter phenotype: cholinergic differentiation of sympathetic neurons is mediated in vivo by gp130 signaling. *Development* 133, 383–383 (2005).

SUY, Simeng et al. Expression of voltage-gated sodium channel Nav1. 8 in human prostate cancer is associated with high histological grade. **Journal of clinical & experimental oncology**, v. 1, n. 2, 2012.

Szpunar, M. J., Belcher, E. K., Dawes, R. P. & Madden, K. S. Sympathetic innervation, norepinephrine content, and norepinephrine turnover in orthotopic and spontaneous models of breast cancer. *Brain Behav. Immun.* 53, 223–233 (2016).

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

Tan, X. *et al.* Fibras nervosas no microambiente tumoral em câncer neurotrópico-câncer de pâncreas e colangiocarcinoma. **Oncogene** 40 , 899–908 (2020).

TANAKA, Kenichi e cols. Agravamento do câncer devido a sinais de dor persistente com o aumento da expressão de mediadores relacionados à dor em neurônios sensoriais de camundongos portadores de tumor. **Cérebro Molecular** , v. 16, n. 1, pág. 19 de 2023.

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

TEDOLDI, Angelo; ARGENT, Liam; MONTGOMERY, Johanna M. The role of the tripartite synapse in the heart: how glial cells may contribute to the physiology and pathophysiology of the intracardiac nervous system. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 320, n. 1, p. C1-C14, 2021.

THAU, Lauren; REDDY, Vamsi; SINGH, Paramvir. *Anatomy, central nervous system*. 2019.

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

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

TURLEY, Shannon J.; CREMASCO, Viviana; ASTARITA, Jillian L. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. **Nature reviews immunology**, v. 15, n. 11, p. 669-682, 2015.

VRONTOU, Sophia *et al.* Genetic identification of C fibres that detect massage-like stroking of hairy skin in vivo. **Nature**, v. 493, n. 7434, p. 669-673, 2013.

Waldmann J, Fendrich V, Reichert M, Hecker A, Bartsch DK, Padberg W and Holler JPN (2018) Expression of neuropeptide Y and its receptors Y1 and Y2 in pancreatic intraepithelial neoplasia and invasive pancreatic cancer in a transgenic mouse model and human samples of pancreatic cancer.

Wang, H., Zheng, Q., Lu, Z. *et al.* Role of the nervous system in cancers: a review. **Cell Death Discov.** 7, 76 (2021).

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

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

WESS, Jürgen; NAKAJIMA, Kenichiro; JAIN, Shalini. Novel designer receptors to probe GPCR signaling and physiology. *Trends in pharmacological sciences*, v. 34, n. 7, p. 385-392, 2013.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. <https://www.iarc.who.int/cancer-topics/#country>. Acesso em: 04/12/2023

Xia S, He C, Zhu Y, Wang S, Li H, Zhang Z, et al. GABABR-Induced EGFR transactivation promotes migration of human prostate cancer cells. *Mol Pharm*. 2017;92:265–77.

Xia Y, Wei Y, Li Z-Y, Cai X-Y, Zhang L-L, Dong X-R, Zhang S, Zhang R-G, Meng R, Zhu FJB, behavior, and immunity (2019) Catecholamines contribute to the neovascularization of lung cancer via tumor-associated macrophages. 81:111-121.

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

Yu H, Xia H, Tang Q, Xu H, Wei G, Chen Y, et al. Acetylcholine acts through M3 muscarinic receptor to activate the EGFR signaling and promotes gastric cancer cell proliferation. *Sci Rep*. 2017;7:40802.

ZAGAMI, Paola; CAREY, Lisa Anne. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. **NPJ Breast Cancer**, v. 8, n. 1, p. 95, 2022.

Zahalka, A.H., Frenette, P.S. Nerves in cancer. *Nat Rev Cancer* 20, 143–157 (2020).

Zhao, C. M. et al. Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Sci. Transl Med.* 6, 250ra115 (2014).

Zou Z , Bellenger S , Massey KA , et al. A inibição da via HER2 por ácidos graxos poliinsaturados n-3 previne o câncer de mama em camundongos transgênicos fat-1 . *J Lipid Res* . 2013.

10. ANEXO

Anexo 1: Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Papel da inervação sensorial na progressão dos tumores de mama em camundongos C57BL/6", protocolo do CEUA: 69/2023 sob a responsabilidade de Alexander Birbrair que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/05/2023.

Vigência da Autorização	29/05/2023 a 28/05/2028
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav 1.8-CretdTomato
Nº de animais	4
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav 1.8-CretdTomato
Nº de animais	4
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / HM3Dq
Nº de animais	4
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / HM4Di
Nº de animais	4
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav 1.8-Cre
Nº de animais	4
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de

	Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre-TdTomato
Nº de animais	2
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre
Nº de animais	2
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / tdTomato
Nº de animais	2
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / HM4Di
Nº de animais	2
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / HM3Dq
Nº de animais	2
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre+TdTomato/hM3Dq+
Nº de animais	7
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre+TdTomato/hM3Dq+
Nº de animais	7
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre+TdTomato/hM3Dq+
Nº de animais	7
Peso/Idade	20g / 2(meses)

Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre+TdTomato/hM3Dq+
Nº de animais	7
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre+TdTomato/hM3Dq+
Nº de animais	7
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre+TdTomato/hM3Dq+
Nº de animais	7
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre+TdTomato/hM3Dq+
Nº de animais	7
Peso/Idade	20g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / HM3Dq
Nº de animais	2
Idade	2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / HM3Dq
Nº de animais	4
Idade	2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / HM4Di
Nº de animais	2
Idade	2(meses)
Sexo	masculino

Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / HM4Di
Nº de animais	4
Idade	2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav 1.8-Cre
Nº de animais	4
Idade	2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav 1.8-CretdTomato
Nº de animais	8
Idade	2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre
Nº de animais	2
Idade	2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre-TdTomato
Nº de animais	2
Idade	2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / Nav1.8-Cre+TdTomato/hM3Dq+
Nº de animais	49
Idade	2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / tdTomato
Nº de animais	2
Idade	2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Considerações posteriores:

29/05/2023	Aprovado na reunião extraordinária on-line do dia 29/05/2023. Validade: 29/05/2023 à 28/05/2028.
------------	--

Belo Horizonte, 08/01/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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