

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
ESTRUTURAL APLICADAS

Caracterização das atividades biológicas da proteína recombinante P21 de
Trypanosoma cruzi sobre linhagem celular tumoral de mama *in vitro*.

BRUNA CRISTINA BORGES

Uberlândia
Fevereiro - 2015

BRUNA CRISTINA BORGES

Caracterização das atividades biológicas da proteína recombinante P21 de *Trypanosoma cruzi* sobre linhagem celular tumoral de mama *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Uberlândia
Fevereiro - 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu professor orientador Dr. Claudio Vieira da Silva, que me aceitou desde a iniciação científica, me apoiou e me estimulou a continuar no caminho da pesquisa, abrindo um novo caminho na minha vida. Sou e serei eternamente grata a você! Obrigada por acreditar em mim e nos demais orientandos nos momentos difíceis. Você é um ótimo profissional, brilhante pesquisador, com mil ideias geniais, pode ter certeza que você vai brilhar mais ainda!

Agradeço muito aos amigos que fiz no Laboratório de Tripanossomatídeos. Agradeço muito a vocês por me ajudarem, terem paciência comigo e por terem me acolhido tão bem! Esses anos não teriam sido tão bons se não fosse a presença diária de vocês. Muito obrigada Ana Flávia, Ana Clara, Amanda, Adele, Aline, Flávia, Fabrício, João, Marlus, Paula, Patrícia, Rosi, Rebeca, Samuca, Thaise.

Agradeço a minha querida mãe e a meu pai, Norma e Geraldo, e a meu irmão, Deivid, que sempre apoiam as minhas decisões, sempre se alegram com as minhas vitórias e me fortificam nas tristezas. Vocês são a base de tudo. Se sou alguma coisa hoje, devo tudo a vocês. A educação, o carinho e a estrutura que vocês me dão!

Agradeço ao meu lindo namorado, Rodrigo, pela paciência, por ir comigo ao laboratório aos fins de semana, por estar sempre comigo e sempre apoiando as minhas decisões. Você sabe o quanto é importante na minha vida!

Agradeço as minhas belas amigas, as que carrego comigo desde o Marista, minhas amigas da Odonto e os outros amigos tragos pela vida. Espero que entendam se estive ausente em alguns momentos, a vida de adulto chegou para todos nós e por isso, acabamos não nos vendo tanto. Mesmo assim, meus sentimentos continuam os mesmos, tenho muito carinho e amor por vocês. Não seria nada sem meus amigos! Shenore!

Agradeço ao professor Dr. Marcelo José Barbosa Silva, meu co-orientador, por ter aceito a co-orientação de imediato, por ter acreditado em mim, pelos puxões de orelha e pela paciência. Com certeza, essa parceria foi essencial! Agradeço também aos alunos do Laboratório de Osteoimunologia e Imunologia dos Tumores, Ana Carolina, Brunna, Danielle, Felipe, Lívia e Mariana.

Agradeço a técnica Dona Zilda, que sempre esteve pronta para tentar organizar nosso laboratório. E a técnica da Imunologia, Ana Cláudia Pajuaba, por sempre se prontificar a me ajudar, mesmo atarefada.

Agradeço ao Programa de Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, aos ótimos e queridos mestres que compõe esse programa, a secretária, Renata, pela paciência e dedicação e, a todos os colegas de mestrado, pois enfrentamos toda essa maratona juntos. Tenho muito orgulho de fazer parte do PPGBC e torço muito para que o programa só cresça!

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia por todo o conhecimento e experiência que aqui adquiri. E aos órgãos FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro durante estes dois anos.

Agradeço muito a Deus por ter colocado todas essas pessoas na minha vida, pessoas de muita luz, que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse projeto.

*“Quando achar que é um dia difícil, lembre-se de olhar pra você e aonde quer chegar.
Não dá pra esperar só flores sem espinhos.”*

Banda Mato seco

RESUMO

Vários estudos envolvendo infecção por *Trypanosoma cruzi* têm mostrado características anti-tumorais tanto do parasita quanto de algumas de suas proteínas. Uma proteína com peso molecular de 21kDa foi sequenciada, clonada e caracterizada sendo uma proteína secretada pelo parasita e que está envolvida diretamente na invasão celular por formas amastigota e tripomastigota, essa proteína foi denominada de P21. Estudos desenvolvidos com a forma recombinante dessa proteína, rP21 mostra que ela apresenta algumas atividades biológicas, o que poderia garantir algum papel benéfico dessa proteína em processos inflamatórios e até mesmo no desenvolvimento de tumores. O câncer de mama é o segundo tipo mais comum de câncer no mundo, sendo que o modelo experimental utilizado mais comumente para representá-lo é o tumor de Ehrlich. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da proteína recombinante rP21 de *T. cruzi* em células de tumor de Ehrlich. Inicialmente, a viabilidade celular foi analisada utilizando células de Ehrlich e macrófagos peritoneais de BALB/c expostos a diferentes concentrações de rP21 em diferentes tempos de exposição, sendo que ambos os tipos celulares permaneceram viáveis em todos os tempos e concentrações da proteína. O efeito quimioatraente desta proteína foi avaliada por um ensaio de invasão, que demonstrou que a proteína não foi capaz de induzir a invasão de células de Ehrlich, no entanto, a proteína foi capaz de induzir a invasão de macrófagos peritoneais. Após isso, a capacidade de polimerização do citoesqueleto de actina pela rP21 foi analisada, mostrando que a proteína apresenta a capacidade de polimerização do citoesqueleto de uma forma dose-dependente. Também foi visto que no modelo de tumor sólido de Ehrlich, o tratamento com a rP21 demonstrou inibir o crescimento tumoral. A partir dessas características, as atividades biológicas da proteína rP21 são reafirmadas, mostrando a possibilidade de um emprego da proteína no tratamento anti-tumoral.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, rP21, anti-tumoral

ABSTRACT

Several studies involving *Trypanosoma cruzi* infection have shown anti-tumor characteristics of the parasite and some of its proteins. A protein with a molecular weight of 21kDa was sequenced, cloned and characterized as being a protein secreted by the parasite which is directly involved in cell invasion by amastigote and trypomastigote forms, this protein was named P21. Studies carried out with recombinant form of this protein, rP21 shows that it has some biological activities which may some beneficial role of this protein in inflammatory processes and even the development of tumors. Breast cancer is the second most common cancer in the world and the experimental model used most commonly to represent is the Ehrlich tumor. This study aimed to evaluate the effects of recombinant protein rP21 of *T. cruzi* in Ehrlich tumor cells. Initially, the cell viability was analyzed using Ehrlich cells and peritoneal macrophages from BALB/c mice exposed to different concentrations of rP21 in different exposure times and both types of cells remained viable at all times and the protein concentrations. The effect of this chemoattractant protein was evaluated by an invasion assay, which demonstrated that the protein was not able to induce cell invasion Ehrlich, however, the protein was able to induce the invasion of peritoneal macrophages. After that, the capacity of the polymerization of actin cytoskeleton by rP21 was analyzed, showing that the protein is capable of polymerization cytoskeleton in a dose-dependent manner. It was also seen that the solid Ehrlich tumor model, treatment with rP21 shown to inhibit tumor growth. From these features, the biological activities of the protein rP21 are restated, showing the possibility of use of the protein in the anti-tumor treatment.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, rP21, anti-tumoral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Purificação da rP21.....	26
Figura 2: Ensaio de viabilidade utilizando diferentes concentrações de rP21 em diferentes tempos de exposição em Células de Ehrlich.....	28
Figura 3: Ensaio de viabilidade utilizando diferentes concentrações de rP21 em diferentes tempos de exposição em Macrófagos peritoneais.....	29
Figura 4: Polimerização do citoesqueleto de actina.....	30
Figura 5: Invasão de células de Ehrlich e macrófagos peritoneais em um modelo de membrana basal tratando com rP21.....	32
Figura 6: Cinética de crescimento do Tumor de Ehrlich na pata de camundongos C57BL/6.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% Porcentagem

°C Graus Celsius

µg Microgramas

µL Microlitros

Akt Proteína Kinase B

ATP Adenosina Trifosfato

CO₂ Dióxido de Carbono

DNA Ácido desoxirribonucleico

IPTG Isopropylthio-β-galactoside

kDa Quilo Dalton

L Litros

LB Meio Luria-Bertani

mL Mililitros

M Molar

mM Milimolar

MPO Mieloperoxidase

NAG N-acetilglucosaminidase

NF-κB Fator nuclear kappa B

nm Nanômetro

OD Densidade Óptica (absorbância)

PBS Solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2

pH Potencial hidrogênionico

RPM Rotações por minuto

RPMI Meio Roswell Park Memorial Institute

SFB Soro Fetal Bovino

shRNA Small hairpin RNA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e Câncer	12
1.3 Outros parasitas e atividade anti-tumoral	14
1.4 Proteína P21	14
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. METODOLOGIA	19
4.1 Aspectos Éticos do Estudo.....	19
4.2 Animais	19
4.3 Cultura celular.....	19
4.4 Purificação e renovamento da proteína P21 (Silva et al., 2009; dos Santos et al., 2013).....	20
4.5 Viabilidade Celular	21
4.6 Ensaio de Polimerização do Citoesqueleto de Actina.....	22
4.7 Invasão celular	23
4.8 Indução de Tumor Sólido in vivo	23
4.9 Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Purificação da rP21	25
5.2 Ensaio de Citotoxicidade	27
5.3 Ensaio de Polimerização de Actina.....	30
5.4 Ensaio de Migração celular.....	31
5.5 rP21 foi capaz de diminuir o tumor sólido em pata de camundongos C57BL/6.	33
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi, *T. cruzi*, é um parasita flagelado intracelular obrigatório pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e possui três apresentações morfológicas distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O desenvolvimento entre um estágio e outro é um processo complexo, envolvendo muitas mudanças estruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

A estratégia chave para o sucesso do parasita no processo de infecção dos hospedeiros mamíferos está na penetração de tripomastigotas metacíclicas nas células alvo (MANQUE *et al.*, 2003).

O processo de invasão de uma célula hospedeira por *T. cruzi* pode ser dividido em três estágios: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. A adesão envolve o reconhecimento e a interação entre as moléculas de superfície do parasita e da célula hospedeira. Diferentes cepas de *T. cruzi*, assim como diferentes formas do parasita (amastigotas, tripomastigotas de cultura de tecido e tripomastigotas metacíclicos) expressam diferentes moléculas em sua superfície, as quais interagem com componentes das células hospedeiras durante a invasão. Além disso, não podemos excluir a possibilidade das moléculas secretadas pelo parasita também exercerem um papel fundamental na invasão (SOUZA *et al.*, 2010). Após a adesão e reconhecimento do parasita pela superfície da célula hospedeira, uma série de processos de sinalização celular ocorrem culminando na invasão da célula hospedeira. Um mecanismo de entrada é a fagocitose, onde as células emitem pseudópodes e há participação de filamentos de actina. Em fagócitos profissionais, como macrófagos, há a ativação de proteínas tirosina quinases, seguida do recrutamento de PI3-quinase e filamentos de actina no ponto de entrada do tripomastigota, mostrando que a fagocitose é o principal mecanismo de *T. cruzi* na entrada em macrófagos. Já em células não-fagocíticas, essa entrada do parasita ocorre em uma via independente de lisossomos (BARRIAS *et al.*, 2010).

Sendo assim, sabe-se que moléculas tanto da superfície da célula hospedeira quanto da superfície do parasita são importantes no processo de invasão, sendo necessária a interação entre os ligantes da superfície do parasita com os receptores na célula alvo. As proteínas presentes na superfície do parasita e que são secretadas por ele

têm demonstrado ter um potencial maior do que apenas no desenvolvimento da doença de Chagas.

1.2 *Trypanosoma cruzi* e Câncer

Em 1946, os cientistas soviéticos Nina Kliueva e Grigorii Roskin anunciaram que em suas pesquisas descobriram que o emprego de cepas de *T. cruzi* tinham efeito bio-terapêutico no tratamento de carcinomas em camundongos e, posteriormente, verificaram que o uso de extratos de parasitos inoculados vivos tinham o mesmo efeito (KLIUEVA & ROSKIN, 1946). Assim, eles desenvolveram um composto do parasita denominado KR para estudos experimentais e clínicos, porém devido a Guerra Fria, as pesquisas foram abandonadas e até 1950 nenhum outro estudo havia sido publicado sobre a atividade anti-carcinogênica do *T. cruzi* (KREMENTSOV, 2009).

Recentemente, diversos estudos relacionando a influência da parasitemia do *T. cruzi* em modelos tumorais foram publicados (CABRAL, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001; SHEKLAKOVA *et al.*, 2003; LOPEZ *et al.*, 2010; RAMIREZ *et al.*, 2012; ZHIGUNOVA *et al.*, 2013), em um deles foi visto que a infecção crônica por *T. cruzi* diminui a incidência de câncer de colón em ratos induzido por dimetilhidrazina, sendo o possível motivo o comprometimento das fibras nervosas do colón (OLIVEIRA *et al.*, 2001). O tratamento de células tumorais de mama com o lisado da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrou que ocorreu a inibição do crescimento das células tumorais e que esse efeito está relacionado com as características genéticas e a cepa do parasita (SHEKLAKOVA *et al.*, 2003; BATMONKH *et al.*, 2006; ATAYDE *et al.*, 2008). Outro experimento *in vivo* mostrou que camundongos infectados com *T. cruzi* e, posteriormente, desafiados com células do sarcoma 180 e com células de Ehrlich, apresentaram redução do tumor (KALLINIKOVA *et al.*, 2006)

Diferentes tipos de carcinomas e sarcomas foram avaliados e foi visto que camundongos infectados com *T. cruzi* tinham o volume diminuído dos tumores. Esta atividade pode estar relacionada a substâncias secretadas pelos parasitas que ficaram conhecidas como substâncias cancerolíticas (HAUSCHKA *et al.*, 1947; HAUSCHKA & GOODWIN, 1948).

Esse efeito anti-tumoral, seja da infecção crônica pelo *T. cruzi*, ou seja pelo extrato da forma epimastigota, parece estar relacionado com os epítópos que os抗ígenos do

parasita compartilham com os抗ígenos tumorais. Para comprovar, um estudo foi realizado imunizando camundongos com抗ígenos derivados da forma epimastigota de *T.cruzi*. Os esplenócitos foram isolados e transplantados em camundongos com adenocarcinoma de Ehrlich e, surpreendentemente, esse tumor não desenvolveu nesses animais, indicando que a resposta celular direcionada a *T. cruzi* é também direcionada para o tumor de Ehrlich. Com isso, demonstrou-se que抗ígenos de *T.cruzi* e das células do tumor de Ehrlich, possuem epítópos em comum já demonstrados como sendo as mucinas, principalmente, do tipo O-glicosiladas (OSINAGA, 2007; ZENINA *et al.*, 2008; ZHIGUNOVA *et al.*, 2013).

Estudos mostraram que duas outras proteínas presentes no *T. cruzi* apresentam atividade anti-tumoral. Foi visto que a forma recombinante da proteína GP82, específica da forma tripomastigota metacíclica de *T. cruzi* é capaz de induzir apoptose de células de melanoma *in vitro* e reduzir tumor *in vivo*, pois ela está relacionada à indução de exposição de fosfatidilserina, alteração na morfologia celular, fragmentação do DNA, aumento na despolarização mitocondrial com aumento na atividade de caspase-3 e retenção citoplasmática do fator de transcrição NF-κB (ATAYDE *et al.*, 2008). NF-κB é um fator de transcrição que participa na resposta inflamatória, sendo que no citoplasma ele está no seu estado inativo e, quando fosforilado, transloca-se para o núcleo e promove a transcrição de genes. Em alguns tipos de câncer, estímulos induzem a fosforilação e, consequentemente, sua translocação para o núcleo, iniciando a indução da produção de oncogenes (KARIN 2010). Também foi demonstrado que a chaperona molecular calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) é capaz de translocar para a membrana plasmática do parasita e inibir as cascatas de ativação do sistema complemento favorecendo a infecção. Além disso, a calreticulina possui um fragmento na porção N-terminal, denominada vasostatina, que é capaz de impedir a ligação das células endoteliais a matriz extracelular. Essa característica garante a calreticulina uma atividade antiangiogênica e, por isso, ela é capaz de apresentar propriedades anti-tumorais *in vivo* (LOPEZ *et al.*, 2010, RAMIREZ *et al.*, 2012).

Demonstrou-se, ainda, que o parasita constitui em um vetor capaz de ser modificado geneticamente para a expressão de抗ígenos tumorais como o NY-ESO-1, aumentando a imunidade mediada por células T, sugerindo assim o possível emprego de cepas não virulentas em protocolos vacinais anti-tumorais (JUNQUEIRA *et al.*, 2011; JUNQUEIRA *et al.*, 2012).

1.3 Outros parasitas e atividade anti-tumoral

Efeitos anti-tumorais têm sido relatados para uma variedade de infecções por outros agentes infecciosos, além do *T. cruzi*. Modelos animais com desenvolvimento espontâneo de tumores mamários e leucemia tiveram os tumores suprimidos após injeção do antígeno de *Toxoplasma*, *T. gondii*, ou dos parasitas viáveis (HIBBS *et al.*, 1971; MIYAHARA *et al.*, 1992). Também foi visto que camundongos infectados com *T. gondii* tiveram a diminuição do crescimento do carcinoma pulmonar de Lewis, associado a atividade anti-angiogênica (KIM *et al.*, 2007). Ainda relacionado ao carcinoma pulmonar de Lewis, foi visto que animais com infecção por *Plasmodium* tiveram a inibição do crescimento das células tumorais e de metástases, assim como tiveram sua sobrevida aumentada (CHEN *et al.*, 2011). Um estudo realizado para relacionar a infecção por *Strongyloides stercoralis* e o desenvolvimento de leucemia de células T em adultos mostrou que a sobrevida desses pacientes foi maior do que os pacientes que não tinham a infecção (PLUMELLE *et al.*, 1997). O uso da ameba de vida-livre *Acanthamoeba castellanii* mostrou que a injeção desses parasitas viáveis ou do seu lisado foi capaz de reduzir o volume tumoral de melanomas *in vivo* (PIDHERNEY *et al.*, 1993).

Acredita-se que parasitas e o câncer possuem抗ígenos em comum, como mucinas do tipo O glicosiladas, sendo assim o câncer poderia ser considerado pelo sistema como “outro parasita” e assim ser submetido a resposta imune concomitante a infecção parasitária (CLEGG *et al.*, 1971). Existem alguns mecanismos sugeridos pelos quais a infecção pelo parasita pode induzir uma atividade anti-tumoral: 1) devido a resposta imune inata inespecífica mediada pelo receptores Toll-like, 2) pela resposta imune adquirida por meio da produção de anticorpos, como anticorpos contra *T. cruzi* que contribuem na proteção contra o câncer (KALLINIKOVA *et al.*, 2006), 3) ou por enzimas secretadas pelos parasitas podem agir contra os tumores, principalmente, proteases (DARANI & YOUSEFI, 2012).

1.4 Proteína P21

Em 2009 foi sequenciada, clonada e caracterizada uma proteína de *T. cruzi* que é expressa por todas as formas evolutivas do parasita e desempenha papel importante durante a invasão de tripomastigotas e amastigotas extracelulares em células fagocíticas

e não fagocíticas. Por possuir a massa molar de 21 KDa foi denominada de P21 (SILVA *et al.*, 2009). Sua forma recombinante (rP21) é uma forma que adere à células de mamífero de maneira dose-dependente, apresenta atividade que regula positivamente a fagocitose em células não fagocíticas (SILVA *et al.*, 2009). Em macrófagos também foi visto que a forma recombinante da P21 aumenta a sua capacidade fagocítica por um mecanismo dependente da ligação da proteína ao receptor de quimiocinas CXCR4, induzindo a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira e sinalização via PI3-quinase. A via de sinalização PI3-quinase é capaz de ativar a via Akt a qual pode interagir com proteínas responsáveis pela proliferação celular, como NF- κB e com reguladores da apoptose, os quais são eventos importantes durante processos de inflamação, angiogênese e reparo tecidual. (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Experimentos utilizando o tratamento de mioblastos com a proteína rP21 mostraram que houve uma diminuição significativa da multiplicação do *T. cruzi* dentro das células juntamente com o aumento da polimerização de actina da célula alvo (MARTINS, 2013). Além disso, outros experimentos mostraram que o tratamento de mioblastos e macrófagos com shRNA para proteínas associadas a polimerização de actina, como ARP-2, WASP e AFAP1-L1 apresentaram maior multiplicação do parasita quando comparadas aos controles, sendo que esta maior multiplicação pode ter ocorrido devido ao um citoesqueleto menos rígido (ARAÚJO, 2014).

Em um experimento *in vivo* com um modelo utilizando esponja no dorso dos camundongos padronizadas por Bailey *et al.*, 1988 e Grindlay *et al.*, 1951, doses de rP21 (10μg, 40μg ou 100μg) foram injetadas a cada 72 horas durante nove dias. Entre as análises feitas, observou-se que a quantidade de hemoglobina foi significativamente reduzida, no grupo tratado com a proteína recombinante, sugerindo que ela estaria agindo de maneira anti-angiogênica, reduzindo a produção de vasos sanguíneos decorrente do processo inflamatório de corpo estranho. Além de verificar o maior recrutamento de células como neutrófilos e macrófagos que se mostraram mais ativos do que as células do grupo controle, por meio da dosagem das enzimas MPO e NAG (MACHADO, 2014).

A fim de reforçar esses achados, foi realizado um experimento utilizando células endoteliais derivadas de hemangioma de timo de camundongos (tEND) tratadas com rP21 para verificar se a proteína influenciaria a formação de vasos sanguíneos. As células foram plaqueadas em matrigel e pré-incubadas com 10, 40 e 80 μg/mL de rP21 por 30 minutos, após esse tempo as células foram mantidas em cultura por 18 horas e

imagens foram feitas. Foi visto que nas três concentrações distintas da rP21, a formação de vasos sanguíneos foi inibida de maneira dose-dependente quando comparado com o grupo sem tratamento (SILVA *et al.*, manuscrito submetido).

Em relação ao recrutamento de células do sistema imune, foi realizado um experimento *in vivo* no qual camundongos C57BL/6 foram separados em dois grupos com diferentes tratamentos via intraperitoneal: PBS e 40 μ g/mL de rP21. Os animais de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical nos tempos de cinética de 6, 24 e 72 horas, sendo recolhido o lavado peritoneal. Foi analisado o recrutamento total de leucócitos por contagem em Câmara de Neubauer e, posteriormente, foi realizado citometria de fluxo para identificação dos tipos populacionais. Assim sendo, foi visto que os animais injetados com rP21 apresentavam uma população de células bem maior do que os animais injetados com PBS e, quando, analisado o tipo celular, foi visto predominância de polimorfonucleares no tempo de 6 horas, seguido pelo aumento de macrófagos e linfócitos nos tempos de 24 e 72 horas (MACHADO, 2014).

Sendo assim, baseado nesses efeitos biológicos do rP21 que nos remete a efeitos já observados em algumas drogas anti-tumorais, esse projeto tem como principal objetivo investigar os efeitos dessa proteína nas células tumorais de Ehrlich.

2. JUSTIFICATIVA

A proteína recombinante de *T. cruzi* rP21 tem apresentado algumas características biológicas importantes, como atividade anti-angiogênica e recrutamento de células tumorais, como neutrófilos e macrófagos. Sabe-se que a angiogênese favorece o crescimento tumoral por aumentar o aporte sanguíneo e facilitar a eliminação de excretas nitrogenadas. Além disso, a presença de vasos no microambiente tumoral favorece a disseminação das células tumorais e sua instalação em outros nichos, favorecendo assim o desenvolvendo de metástases loco-regional e à distância (MULTHOFF, *et al.*, 2014). Sabe-se, também, que células do sistema imune, como os macrófagos são importantes mediadores da imunidade antitumoral. Macrófagos associados aos tumores (TAM) têm demonstrado ter capacidade de afetar de diversas maneiras o desenvolvimento tumoral. Os macrófagos produzem grande quantidade de fatores de crescimento estimulatórios e inibitórios da angiogênese, enzimas proteolíticas e citocinas (POLVERINI, 1997). Os mecanismos que controlam o balanço entre a produção de fatores estimulatórios e inibitórios não são completamente compreendidos.

O tumor de Ehrlich foi descrito em 1906 como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal & Jahn, é que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais. Tal tumor vem sendo utilizado como modelo de câncer de mama para o estudo de diferentes alvos de drogas antitumorais (SADZUKA *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2002; TERLIKOWSKI *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2009).

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como sendo a prevenção, inibição ou reversão da carcinogênese pela administração de uma ou mais entidades químicas, seja drogas individuais ou naturais que ocorrem naturalmente como constituintes da dieta (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

Com os inúmeros estudos envolvendo *T. cruzi*, suas proteínas e atividade antitumoral e frente as características biológicas encontradas para a proteína P21 de *T. cruzi*, será que essa molécula poderia também apresentar uma atividade anti-tumoral?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da proteína recombinante rP21 de *Trypanosoma cruzi* em linhagem celular tumoral de Ehrlich.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade da proteína rP21 sobre células tumorais.
- Verificar a influência da rP21 na polimerização de monômeros de G-actina.
- Avaliar a atividade quimiotática da rP21 sobre as células tumorais de Ehrlich.
- Verificar a ação da rP21 sobre tumor sólido de Ehrlich *in vivo*.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos do Estudo

O projeto foi submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) sendo aprovado Nº 054/13.

4.2 Animais

Camundongos BALB/c entre 6 e 12 semanas de vida, machos ou fêmeas, foram utilizados para manutenção das células de Ehrlich e para a obtenção de macrófagos peritoneais. Para a indução do tumor sólido de Ehrlich foram utilizados 8 camundongos C57BL/6, fêmeas. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU (CBEA-UFU) em condições padrões de 12 horas de luz e 12 horas no escuro, em temperatura de $25\pm2^{\circ}\text{C}$, com alimento e água *ad libitum*.

4.3 Cultura celular

Foram utilizadas duas linhagens de células para o desenvolvimento desse trabalho, células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich e macrófagos peritoneais.

As células de Ehrlich foram originadas de ascite de camundongos BALB/c, nos quais as mesmas foram previamente inoculadas intra-peritonealmente para o desenvolvimento da forma ascítica do tumor. Após 10 dias, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o líquido ascítico foi aspirado sendo feitas lavagens com PBS 1x estéril em centrifugações de 2000 rpm por 5 minutos. A cultura primária de macrófagos foi realizada obtendo-se essas células a partir do peritônio de animais BALB/c, nos quais 72 horas antes inoculou-se tioglicolato 3% estéril intra-peritoneal para a indução dos macrófagos.

Os tipos celulares foram cultivados em frascos de 25-cm² com meio de crescimento RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB (Nutricell), piruvato de sódio (1100 mg/L) (Sigma P2256), penicilina (60 mg/L) (Ariston), gentamicina (40 mg/L) (Amresco 0304) e estreptomicina (10 mg/L) (Vitrocell 00038), e incubadas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Para a determinação do número de células foi feita a

contagem utilizando câmara de Neubauer e a viabilidade das células foi determinada por exclusão pelo Azul de Tripan previamente a todos os experimentos.

4.4 Purificação e renovelamento da proteína P21 (Silva et al., 2009; dos Santos et al., 2013)

A proteína recombinante rP21 possui uma cauda de histidina, isso garante que ela seja facilmente purificada por meio de protocolos relativamente simples utilizando cromatografia de afinidade, como por exemplo, coluna de níquel. A cauda de histidina é relativamente pequena e não interfere de forma sensível nas propriedades da proteína.

O protocolo de purificação e renovelamento da rP21 utilizado foi o mesmo descrito por Silva e colaboradores (SILVA, *et al.*, 2009). O vetor pET-28a (+) contendo o gene completo para a forma nativa da proteína P21 de *T. cruzi* foi transfetado em *Escherichia coli* BL21. Para o pré-inóculo, uma colônia simples foi colhida e inoculada num frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio LB estéril, onde adicionamos 7 μ L do antibiótico Kanamicina (50 μ g/mL). O frasco foi mantido sob agitação *overnight* a 37°C. No dia seguinte, o pré-inóculo foi colocado em um frasco Erlenmeyer de 4L contendo 1000 mL de meio LB estéril e 100 μ L de Kanamicina. O frasco foi mantido sob agitação contínua a uma temperatura de 37°C até atingir a densidade óptica (OD) de aproximadamente 0,5 à 0,9, o qual foi medida em espectrofotômetro. Para estimular a produção da proteína recombinante acrescentamos IPTG 1M de modo que a concentração final fosse de 0,5mM, manteve-se o frasco sob agitação contínua por três horas. O volume total foi centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento formado basicamente por corpos de inclusão foi dissolvido em solução de Ureia 6M.

Em seguida, para induzir a lise celular utilizou-se a Lisozima, na proporção de 1:1 por 20 minutos, após esse período o extrato bacteriano foi sonicado, usando o Sonicador Branson Sonifier 450, durante vinte ciclos de 1 minuto com 30 segundos de intervalo entre os ciclos. O lisado foi submetido a cromatografia de afinidade usando coluna de Níquel. Utilizou-se 3 mL de coluna, a qual foi lavada e equilibrada com água destilada e tampão de ligação por três vezes usando centrifugação a 2000 rpm por 1 minuto, desprezando o sobrenadante para remover os tampões indesejados. Em seguida, o lisado bacteriano foi incubado com a coluna de níquel, mantida sob agitação *overnight*. Após isso, o lisado foi centrifugado a 2000 rpm por um minuto. Após as

centrifugações, um sendimento foi formado pelas *beads* da coluna de Níquel com a proteína rP21 desenovelada ligada às *beads* pela cauda de histidina. A coluna foi lavada três vezes com os tampões *binding buffer* e depois com *wash buffer*, sendo centrifugada a 2000 rpm por 1 minuto a 4°C e o sobrenadante desprezado. Em seguida, foi feita a lavagem da coluna com *elute buffer* quatro vezes por meio de centrifugação e dessa vez o sobrenadante proveniente de cada lavada foi recolhido, pois contém a proteína de interesse eluída. O propósito de lavar a coluna com estes três tampões um após o outro é que os tampões apresentam concentrações crescentes de imidazol (5mM, 20mM e 1M respectivamente), isso faz com que a proteína seja eluída ao final do processo devido as *beads* da coluna de Níquel apresentarem uma afinidade maior pelo imidazol em relação à cauda de histidina da rP21.

O eluato proveniente da lavagem com o *elute buffer* foi inserido no interior de uma membrana de 3,5 kDa semipermeável e submetido a diálise contra 4L do tampão PBS por 48 horas sob agitação contínua a 4°C para remover impurezas e promover o renovamento da rP21. O tampão PBS foi reposto após o primeiro dia de diálise. Terminada a diálise, a amostra purificada foi aplicada em gel de poliacrilamida para confirmação da sua presença, pureza e a concentração da proteína quantificada por Bradford.

4.5 Viabilidade Celular

Os efeitos da rP21 sobre a viabilidade das células tumorais e dos demais tipos celulares foi analisado pelo teste de Alamar Blue. A Resazurina, princípio do Alamar Blue tem cor azul e não fluorescente, em células viáveis ela é reduzida à resofurin e passa então a apresentar cor rosa e fluorescente. (ROLÓN *et al*, 2006, O'BRIEN *et al*, 2000).

Células de Ehrlich e macrófagos peritoniais foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 por poço em 200 μL de meio de cultura RPMI. A rP21 foi diluída em meio em diferentes concentrações (100, 50, 25, 12.5 e 6.25 $\mu\text{g/mL}$) e foi exposta às células em diversos tempos (1, 4, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Após o término de cada tempo de exposição, o meio com rP21 foi removido, as células foram lavadas com PBS1x estéril e o meio foi reposto sem a proteína. Foram acrescentados 8 e 10 μL de resazurina filtrada nos macrófagos peritoneais e células de Ehrlich,

respectivamente. As células foram mantidas em estufa, cobertas com papel alumínio e o tempo de reação da resazurina foi de 16 à 24 horas. A leitura foi realizada em espectôfotometro (SpectraMax, Molecular Device, Sunnyvale, CA, EUA) a 594 nm, sendo a viabilidade celular expressa em porcentagem.

4.6 Ensaio de Polimerização do Citoesqueleto de Actina

O efeito da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina foi avaliado por meio do kit Actin Polymerization Biochem Kit (Cytoskeleton, Inc. Denver, CO, EUA). A polimerização do citoesqueleto de actina foi detectada pelo aumento na emissão de fluorescência do composto pireno muscular conjugado à actina. O aumento da fluorescência ocorre quando os monômeros de actina globular (G-actina), que estão conjugados ao pireno, se formam em actina filamentosa (F-actina) indicando a polimerização do citoesqueleto de actina. A fluorescência é dada pela excitação de 350 ou 360 +/- 20 nm e emissão de 407 ou 410 +/- 10 nm ou 420 +/- 20 nm. Como controle negativo da reação de polimerização é utilizado apenas o G-Buffer do kit, composto pelo *General Actin buffer* e ATP, como controle positivo de polimerização utilizou-se *G-Buffer* com o fluoróforo pireno muscular. Para essa avaliação, diferentes concentrações da rP21 foram utilizadas (4, 8, 16 e 41 µg/mL). Como indicado pelo protocolo do fabricante, em placas pretas de 96 poços foram colocados os controles tanto negativo quanto controle positivo da reação e, além disso, também utilizou-se apenas o PBS, solução em que a proteína teste estava solubilizada. A captação da fluorescência emitida pelo pireno foi feita no espectofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices).

O experimento ocorreu em uma cinética. Inicialmente, foi distribuído G-Buffer em todos os poços, sendo que no controle negativo sem o composto pireno muscular e nos demais poços com o composto pireno. Após isso foi feita uma leitura da placa por 3 minutos, com intervalo de 60 segundos entre cada ciclo, para estabelecer a baseline de fluorescência dos compostos. Foi feita uma pausa na leitura e acrescentado então ao G-buffer com pireno: PBS e rP21 nas concentrações de 4, 8, 16 e 41 µg/mL. Foi realizada uma leitura de 20 minutos no espectofotômetro, com intervalo de 60 segundos entre cada ciclo para analisar se a proteína ou o soluto dela por si só, já influenciavam a polimerização dos monômeros de actina. Finalizando, foi colocado em todos os poços

um buffer de polimerização de actina e a placa foi mantida no espectofotômetro por 60 minutos. O experimento foi realizado utilizando o espectofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices) e o programa de leitura SoftMax Pro.

4.7 Invasão celular

Para o ensaio de migração celular foi utilizado o kit Chemicon Cell Invasion Assay (EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha). Esse kit avalia a invasão de células por meio de uma membrana semelhante à membrana basal. A membrana presente nos *trans-wells* possui poros de 8 μ m, os quais são cobertos por uma fina camada de matriz extracelular. Inicialmente, a placa de cultura celular presente no kit foi colocada a temperatura ambiente e, após isso, 300 μ L de meio morno sem soro foi colocado nos *trans-wells* por 1 a 2 horas, para hidratação da membrana. Para a realização do experimento foi utilizado de 5×10^5 à 1×10^6 de células em meio sem soro. Abaixo do *trans-wells* colocou-se 500 μ L de meio em três situações: meio com soro fetal bovino, como controle positivo de invasão, meio sem soro fetal bovino, como controle negativo de invasão e meio com 50 μ g/mL de rP21. Após 72 horas, os meios foram removidos e as células que não migraram foram removidas com *swab*. Para corar as células que migraram presentes na superfície inferior da membrana do *trans-well* 500 μ L de cristal de violeta foi colocado em um poço e o *trans-well* mantido no corante por 20 minutos. Após esse tempo, foram feitas lavagens com água e secos ao ar. Para a contagem das células, foram feitas fotografias utilizando o microscópio Leica ICC50 (Wetzlar, Alemanha) pelo software Las Ez. A contagem de células foi feita utilizando 10 campos aleatórios.

4.8 Indução de Tumor Sólido *in vivo*

Camundongos BALB/c com a forma ascítica do tumor foram eutanasiados, o lavado peritoneal contendo as células tumorais foi aspirado e as células de Ehrlich foram injetadas na concentração de 2×10^6 células em 20 μ L de PBS na pata esquerda de oito animais C57BL/6, sendo que na metade deles o tumor foi tratado com 20 μ L PBS e a outra metade recebeu o tratamento com 20 μ g/20 μ L de rP21. No primeiro dia as células foram inoculadas e a partir do segundo dia os animais começaram a receber o

tratamento, sendo o tratamento realizado dia sim, dia não. Antes de injetar o tratamento, as patas eram mensuradas com paquímetro digital, fazendo a medição da altura da pata, tendo como referência o meio da pata, e a largura sendo a distância entre os dedos polegar e mínimo. O volume final de cada pata foi obtido pela fórmula matemática: $a^2 \times b \times 0,5236$, em que “a” e “b” representam a menor e maior medida do tumor, respectivamente. Ao final de 8 dias, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (60 mg/kg) e Xilasina (7,5 mg/kg). As patas foram removidas e mantidas em formol 10% por 48 horas. Após esse período, para ocorrer a descalcificação dos ossos, as patas foram mantidas em EDTA 10%, sendo o líquido trocado a cada 72 horas por 9 dias. Após isso, as patas foram preparadas para inclusão em Álcool Etílico P.A. por 30 minutos, por quatro lavagens, e depois em Xilol por 30 minutos, e três lavagens. As patas seguiram para emblocamento em Parafina I, II e III, durante 90 minutos em cada e inclusas em Parafina. Os blocos foram processados e coloração Hematoxilina e Eosina (HE) foi realizada. As imagens foram obtidas no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, no microscópio Leica ICC50 acoplado a câmera e software Las Ez, no aumento de 4 vezes, sendo que todo o campo da lâmina foi analisado.

4.9 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. A significância das diferenças entre os diferentes tratamentos e tempos foi determinada pelos métodos One way ANOVA, Two way ANOVA, T de student e One sample teste T, utilizando pós-teste de Tukey e Bonferroni no GraphPad Prism versão 6.01 (©GraphPad Software Inc, 1992-2007). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Purificação da rP21

Por meio da técnica de cromatografia de afinidade por coluna de níquel e diálise contra PBS, já pré-estabelecidos por Silva *et al.*, 2009, a purificação da proteína rP21 foi realizada e, para verificar a sua existência e pureza um gel de poliacrilamida foi feito e a concentração da proteína foi dosada pelo método de Bradford (SILVA, *et al.*, 2009, DOS SANTOS *et al.*, 2013).

Por meio do gel de poliacrilamida é possível verificar a presença da banda correspondente à proteína de 21 kDa e, também, sua pureza. Pelo método de Bradford (BRADFORD, 1946), quando comparada à curva-padrão, foi possível quantificar a concentração da proteína presente após a purificação, sendo a concentração obtida de 1,06 mg/mL.

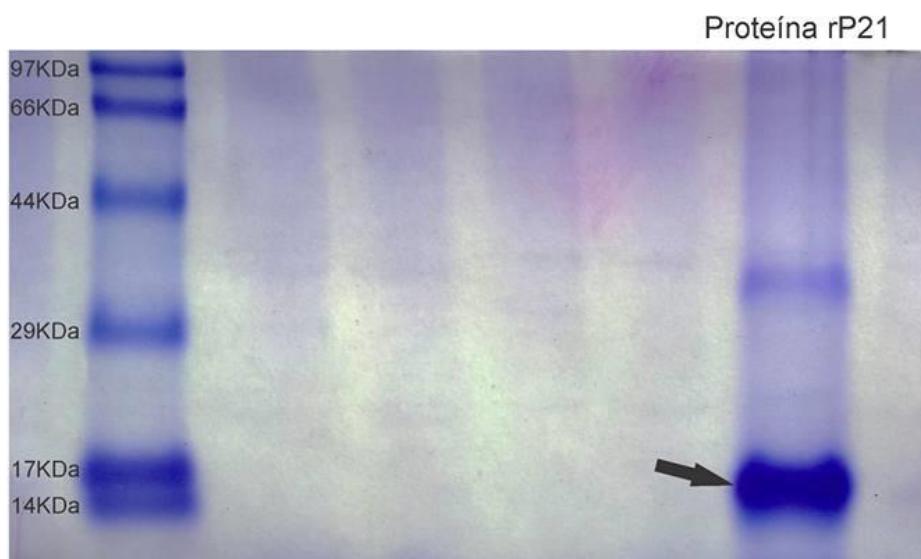
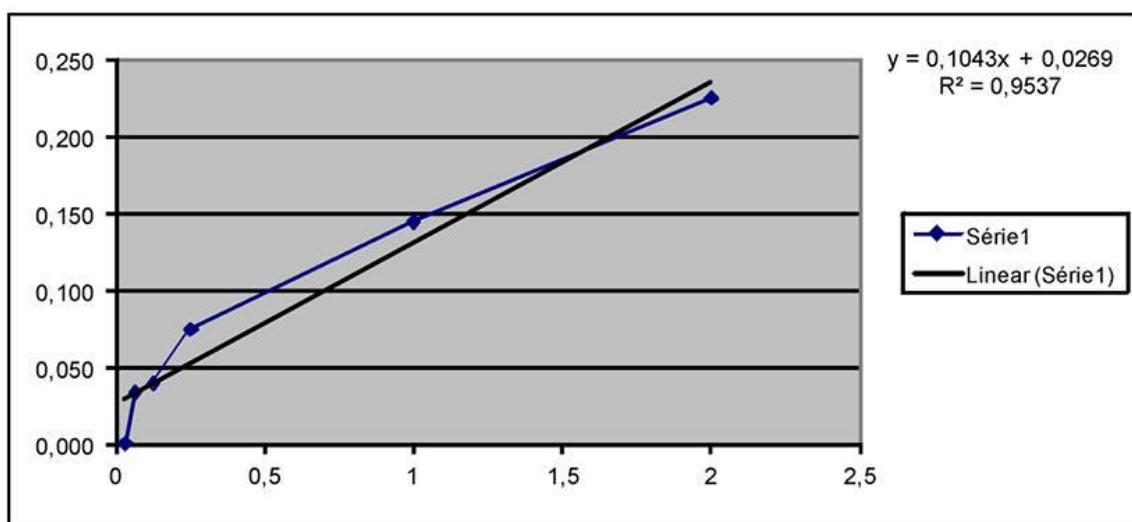
A**B**

Figura 1: Purificação da rP21 A) Gel de poliacrilamida mostrando a pureza da rP21 obtida por meio da fração insolúvel dos corpos de inclusão de bactérias. À esquerda, o peso molecular, a direita mostra a banda correspondente a proteína de 21 kDa, rP21. B) Para a obtenção da concentração da proteína purificada, foi realizada sua dosagem pelo método de Bradford, no qual foi utilizada a proteína de concentração conhecida BSA para a montagem da curva-padrão e obtenção da equação da reta. Na equação da reta, y corresponde à absorbância e x corresponde à concentração. As absorbâncias obtidas pela leitura foram colocadas em y para a descoberta da concentração da proteína rP21.

5.2 Ensaio de Citotoxicidade

Células de Ehrlich e macrófagos peritoneais foram tratados com diferentes concentrações da proteína rP21 (100, 50, 25, 12.5 e 6.25 µg/mL) e em diferentes tempos de exposição (1, 4, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas) para verificar se a proteína seria tóxica para as células tumorais ou para os macrófagos.

A partir dos gráficos obtidos, é possível verificar que a presente proteína não apresentou-se tóxica para nenhum dos tipos celulares, em nenhuma concentração ou tempo.

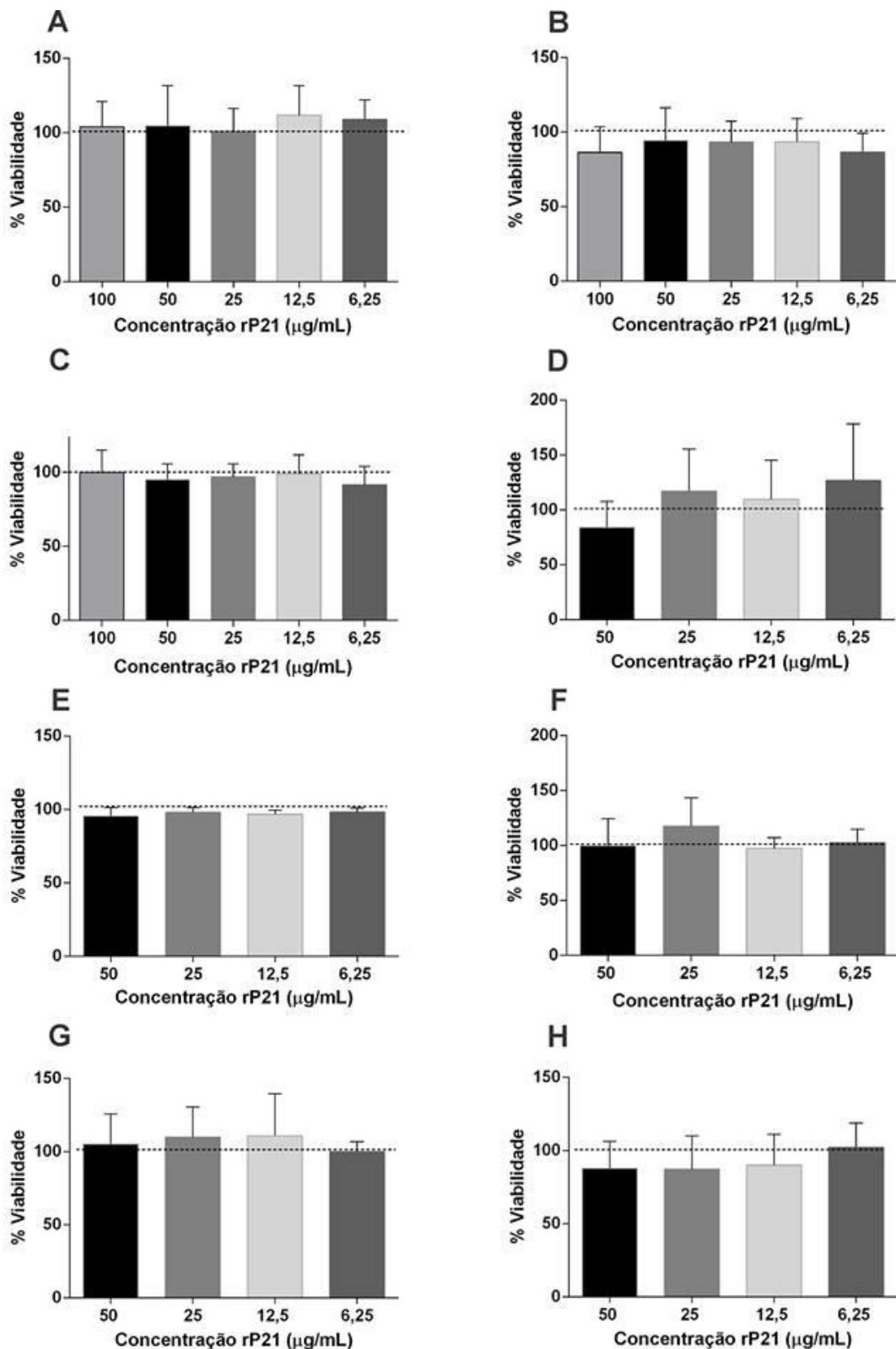


Figura 2: Ensaio de viabilidade utilizando diferentes concentrações de rP21 em diferentes tempos de exposição em linhagem celular de Ehrlich. Células de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações da rP21 (100, 50, 25, 12.5 e 6.25 $\mu\text{g/mL}$) e em diferentes tempos de exposição: A) 1 hora, B) 4 horas, C) 12 horas, D) 24 horas, E) 48 horas, F) 72 horas, G) 96 horas e H) 120 horas. O tratamento com a rP21 não apresentou citotoxicidade para as células de Ehrlich em nenhuma concentração e em

nenhum tempo de exposição quando comparadas ao grupo controle, representado pela linha tracejada.

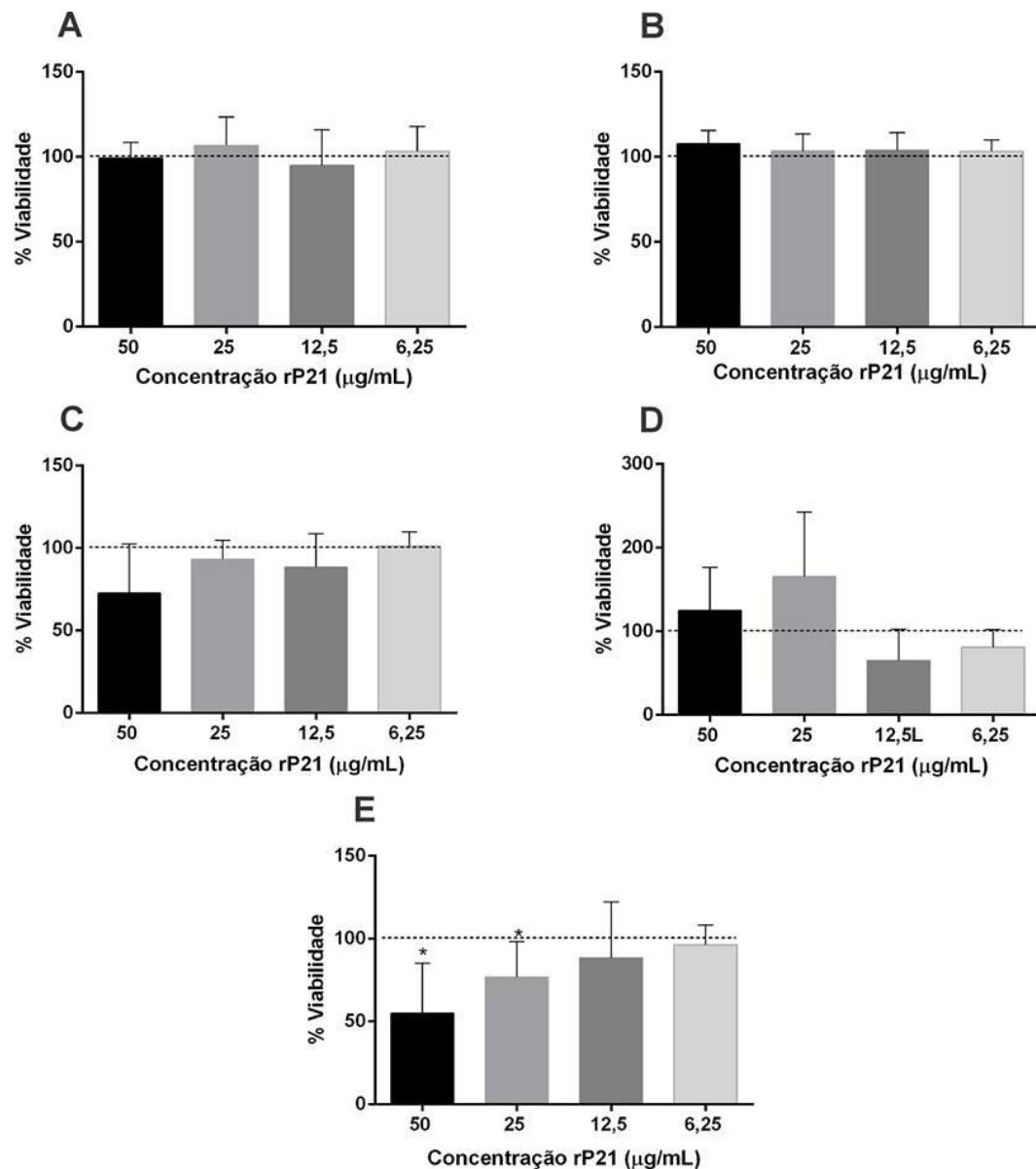


Figura 3: Ensaio de viabilidade utilizando diferentes concentrações de rP21 em diferentes tempos de exposição em Macrófagos peritoneais. Macrófagos peritoneais tratados com diferentes concentrações da rP21 (50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$) e em diferentes tempos de exposição: A) 24 horas, B) 48 horas, C) 72 horas, D) 96 horas e E) 120 horas. O tratamento com a rP21 não apresentou citotoxicidade para os macrófagos peritoneais, quando comparadas ao grupo controle, representado pela linha tracejada, exceto no tempo de 120 horas, nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$, mas acredita-se que isso tenha se dado por serem células de linhagem primária e não conseguirem sobreviver muito tempo em cultura (* $p<0,05$).

5.3 Ensaio de Polimerização de Actina

A partir do kit Actin Polymerization Biochem Kit, o efeito da rP21 em induzir a polimerização do citoesqueleto de actina foi medido. A partir do gráfico obtido é possível verificar que a rP21 é capaz de induzir a polimerização do citoesqueleto de actina de forma dose-dependente.

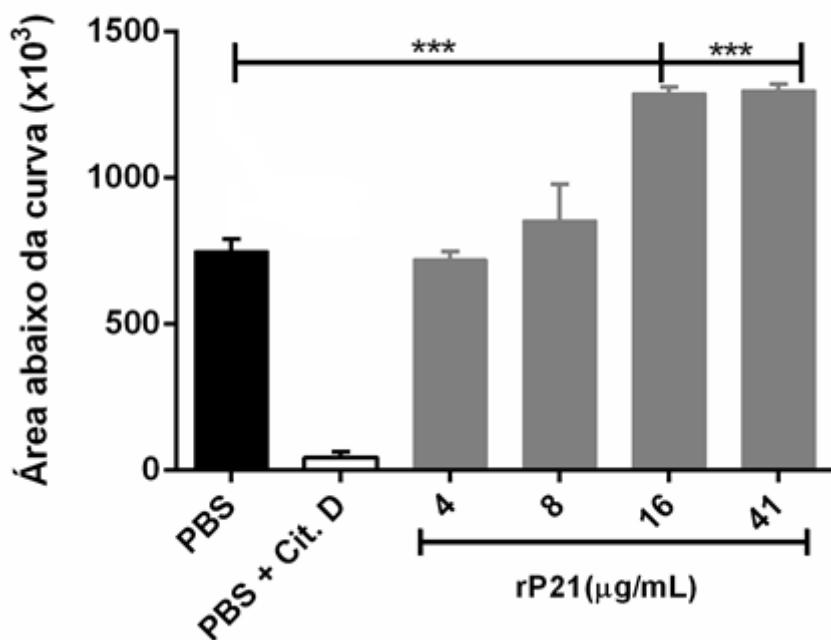


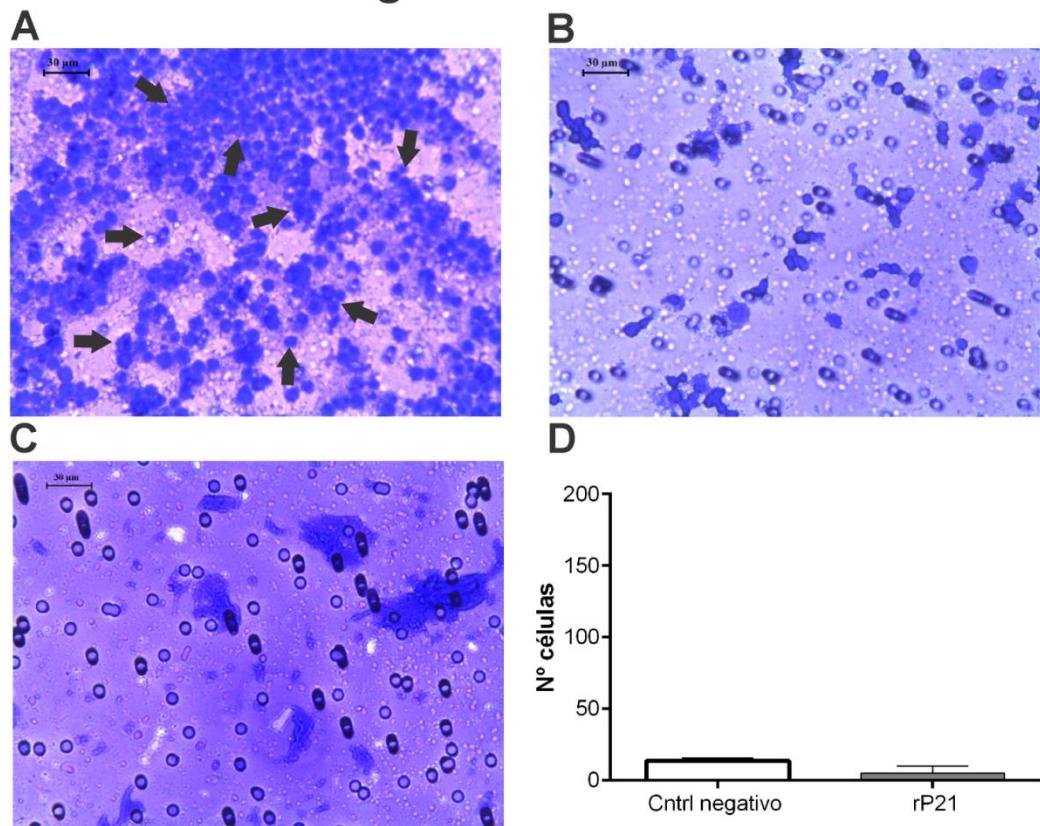
Figura 4. Polimerização do citoesqueleto de actina. A partir do kit Actin Polymerization Biochem Kit, a capacidade da rP21 em induzir a polimerização de actina foi medida, por meio da presença de monômeros de G-actina conjugados a um fluoróforo que, quando se polimerizam formam F-actina e emitem fluorescência. O gráfico foi dado pela área abaixo da curva, que é dada durante a cinética de polimerização. PBS é o solvente da proteína e, este quando associado à citocalasina D mostra que realmente ocorre a inibição do processo de polimerização na presença dessa proteína. Não houve diferença estatística significante entre PBS e as concentrações de 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$, porém houve diferença entre PBS e as concentrações de 16 e 41 $\mu\text{g/mL}$ (**p<0,01). Sendo assim, a rP21 mostrou de maneira dose-dependente induzir a polimerização do citoesqueleto de actina.

5.4 Ensaio de Migração celular

Utilizando células de Ehrlich e macrófagos peritoneais foi analisado o potencial da rP21 em induzir a invasão desses tipos celulares por meio do kit Chemicon Cell Invasion Assay, o qual mimetiza a matriz extracelular.

Os experimentos mostraram que a rP21 foi capaz de induzir a invasão dos macrófagos peritoneais, mas em contraponto não induziu a invasão das células de Ehrlich. Quando comparados ao controle negativo de invasão, é visto que as células de ehrlich tratadas com a rP21 assemelha-se ao controle negativo, já os macrófagos peritoneais apresentaram maior migração do que o controle negativo.

Linhagem celular Ehrlich



MΦ peritoneal

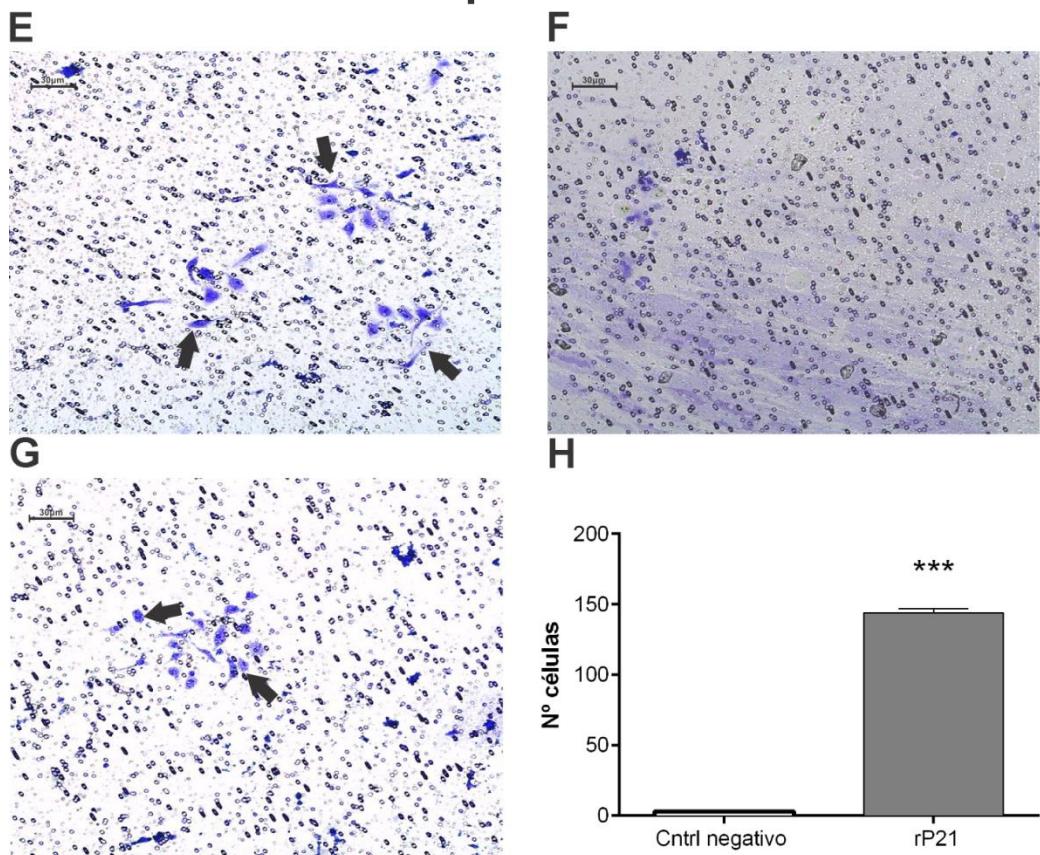


Figura 5: Invasão de células de Ehrlich e macrófagos peritoneais em um modelo de membrana basal tratando com rP21. Células de Ehrlich e macrófagos peritoneais foram analisados quanto a invasão quando estimulados com rP21. Foi utilizado um controle positivo de invasão, utilizando meio de cultura e 10% de SFB e um controle negativo de invasão, utilizando apenas o meio de cultura sem SFB. A) Controle positivo de invasão das células de Ehrlich (apontadas pelas setas). B) Controle negativo de invasão das células de Ehrlich. C) Células de Ehrlich tratadas com a proteína rP21. D) Gráfico mostra que não houve diferença estatística entre o controle negativo de invasão e as células de Ehrlich tratadas com rP21, mostrando que não houve migração em nenhuma das duas situações. E) Controle positivo de invasão dos macrófagos peritoneais (apontadas pelas setas). F) Controle negativo de invasão dos macrófagos peritoneais. G) Macrófagos peritoneais tratados com a proteína rP21. H) Gráfico mostra que houve diferença no número de células que invadiram entre o controle negativo e o grupo tratado com a rP21 (**p<0,01). As imagens foram obtidas em um aumento de 40 vezes.

5.5 rP21 foi capaz de diminuir o tumor sólido em pata de camundongos C57BL/6.

Quando realizado uma cinética de crescimento do Tumor de Ehrlich na pata de camundongos C57BL/6 foi visto que no grupo dos animais tratados com 20 μ g/20 μ L de rP21 (n=4) por 8 dias, apenas um animal desenvolveu o tumor, enquanto os outros três animais apresentaram um quadro de redução do volume do tumor. Já no grupo dos animais tratados com 20 μ L de PBS (n=4), os quatro animais tiveram a progressão do tumor.

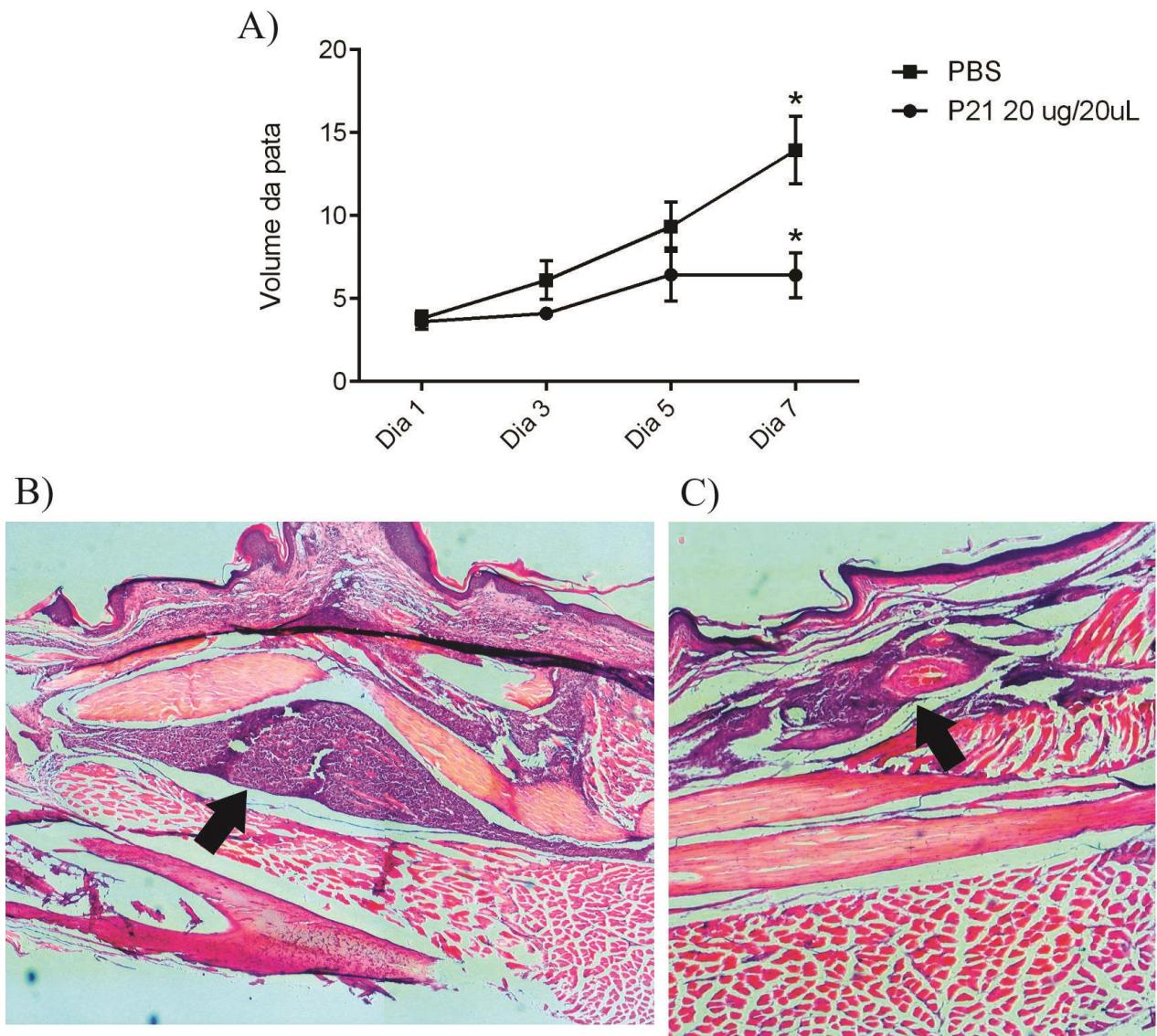


Figura 6: Cinética de crescimento do Tumor de Ehrlich na pata de camundongos C57BL/6. Células de Ehrlich foram inoculadas nas patas de camundongos C57BL/6 para a indução de um tumor sólido. Um dia após a inoculação, o tratamento foi iniciado, sendo utilizado rP21 20 μ g/20 μ L e PBS estéril, sendo que em cada grupo havia 4 animais. O tratamento teve duração de 8 dias, sendo realizado dia sim, dia não, com a medição das patas antes de aplicar o tratamento. A) Gráfico mostra que o volume das patas dos animais com tumor tratados com PBS apresentou-se maior do que o volume das patas dos animais com tumor tratados com rP21 (* $p<0,05$). As imagens histológicas ilustram essa redução em B) tumor no grupo tratado com PBS, em C) tumor no grupo tratado com rP21 (setas). As imagens foram tiradas em aumento de 4x, sendo utilizada a coloração em H.E.

6. DISCUSSÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostrou que as estatísticas mundiais sobre o câncer no ano de 2014 relataram 57.120 novos casos de câncer de mama no Brasil. O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (71,18/ 100 mil), Sul (70,98/ 100 mil), Centro-Oeste (51,30/ 100 mil) e Nordeste (36,74/ 100 mil), respectivamente. Atualmente, o câncer de mama é a maior causa de morte de mulheres em todo o mundo, sendo nos países desenvolvidos, a segunda causa de morte por câncer, atrás somente do câncer de pulmão e, nos países em desenvolvimento, a maior causa de morte por câncer (INCA., 2014). De forma geral, o tratamento para o câncer de mama se dá pela mastectomia unilateral ou bilateral, quimioterapia e radioterapia (KURIAN *et al.*, 2014). Na pesquisa, um modelo usado para o câncer de mama é o Tumor de Ehrlich, carcinoma mamário de camundongos, o qual pode-se desenvolver na forma sólida e na forma ascítica A forma de trabalho utilizada nesse estudo foi o Tumor ascítico de Ehrlich, devido à sua capacidade de crescimento em suspensão no fluido ascítico e por permitir a padronização do número de células a ser inoculado (OLORIS *et al.*, 2002). Existem vários estudos utilizando tal modelo para a descoberta de drogas anti-tumorais (FLORIDI *et al.*, 1981, AHMED *et al.*, 1988, OLORIS *et al.*, 2002, ARAÚJO *et al.*, 2010, BHATTACHARYYA *et al.*, 2003, BATISTA *et al.*, 2013) e relacionando outras doenças na influência do câncer de mama, como hipertireoidismo e hipotireoidismo (SILVA *et al.*, 2004, FERREIRA *et al.*, 2007).

Nosso estudo demonstrou que a rP21 não apresentou papel citotóxico tanto com as células de Ehrlich quanto com os macrófagos peritoneais, mas mostrou que houve inibição do crescimento do tumor sólido de Ehrlich, isso mostra que a rP21 não age na viabilidade das células tumorais diretamente, porém ela parece agir no microambiente tumoral, tentando conter a progressão do tumor.

A partir dos dados obtidos nesse trabalho e, anteriores à ele, pode-se afirmar que a rP21 apresenta algumas atividades biológicas, como a indução da polimerização do citoesqueleto de actina, o recrutamento de células do sistema imune e atividade anti-angiogênica. Relacionando essas atividades ao desenvolvimento do câncer, sabe-se que para que haja a divisão e a migração de células tumorais é necessário que essas células formem o anel contrátil, a partir da polimerização do citoesqueleto (YAMAGUCHIA & CONDEELIS, 2007). Caso essas células permaneçam com o citoesqueleto

polimerizado, essa polimerização pontual seria dificultada, o que dificultaria também a divisão e a migração das células. Nossos resultados mostraram que a rP21 tem a capacidade de induzir a polimerização do citoesqueleto de actina de maneira dose-dependente.

Em relação ao recrutamento de células do sistema imune, estudos em modelos animais e em ensaios clínicos têm demonstrado que a infiltração de células imunitárias nos tumores está associada a uma melhora da sobrevida dos pacientes com uma variedade de câncer. As investigações sobre a relação entre o prognóstico e o infiltrado de células do sistema imunológico no microambiente tumoral em pacientes com câncer indicam que a recorrência pós-tratamento ou metástase é suprimida de forma significativa em casos que apresentam alta infiltração de células imunitárias no tecido do tumor primário (EEROLA *et al.*, 2000, YIN *et al.*, 2003, GAO *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se que o receptor CXCR4 em células tumorais é um receptor importante relacionado a metástase do câncer de mama para o tecido ósseo e que o CXCR2 é um receptor envolvido na migração de células tumorais (HALPERN *et al.*, 2011, AZIM *et al.*, 2012). No câncer de ovário, o CXCR4 apresenta grande importância para a iniciação do tumor e metástase (SALOMONNSON *et al.*, 2013).

Por meio do ensaio de invasão celular confirmamos mais uma vez que a rP21 apresenta capacidade de recrutar macrófagos peritoneais também por meio de um modelo de membrana basal. Estudos sugerem um efeito quimiotático para a proteína recombinante, possivelmente por interagir com o receptor CXCR4 e ativá-lo. Quando realizado o mesmo experimento com células de Ehrlich, foi visto que a mesma não foi recrutada pela proteína recombinante. O fato de não ter ocorrido a invasão das células de Ehrlich, mas a rP21 recrutar células como macrófagos é um fator positivo no contexto de inibir o crescimento do tumor no que diz respeito à presença de células do sistema imunológico, no microambiente tumoral e prognóstico (EEROLA *et al.*, 2000, YIN *et al.*, 2003, GAO *et al.*, 2008). Sabe-se que a inflamação crônica pode atuar no desenvolvimento do câncer, mas ao mesmo tempo, a presença de células inflamatórias pode ajudar a diminuir o crescimento do tumor e, isso fica claro, quando em situações de imunossupressão, em que ocorre o aumento do crescimento tumoral (HAN *et al.*, 2012). Estudos prévios também demonstraram que um dos alvos da rP21 é o receptor da quimiocina CXCL-12, o CXCR4 (RODRIGUES *et al.*, 2012), o qual está envolvido diretamente no processo de quimiotaxia (MURDOCH *et al.*, 2000). Nossos experimentos, portanto confirmam a ligação da rP21 no receptor CXCR4 presente nos

macrófagos. Interessante notar que, apesar das células tumorais de mama, tanto humanas quanto de camundongo expressarem o CXCR4 (AZIM *et al.*, 2012, PAPACHRISTOU *et al.*, 2012), a presença da rP21 não exerce tal efeito como no macrófago, fato que pode estar relacionado com a não-ligação da rP21 no CXCR4 ou com o fato de que a interação rP21-CXCR4 possa sinalizar de forma diferente nessas células, exercendo outros efeitos em células tumorais, como a Ehrlich, ou até mesmo bloqueando esse receptor, fato que precisa ser investigado.

As proteínas de *T. cruzi* que já foram estudadas e mostram propriedade anti-tumoral como a calreticulina apresenta uma característica semelhante à rP21, que é a capacidade de inibir a angiogênese. A calreticulina (CRT) possui três domínios, um domínio ácido C-terminal, um domínio rico em prolina P-terminal e um domínio globular N-terminal. O domínio N-terminal apresenta aminoácidos responsáveis pela ação anti-angiogênica, uma vez que inibem a proliferação das células endoteliais. A maior molécula desses aminoácidos é a vasostatina, que então inibi a angiogênese e a proliferação *in vivo* inibindo o fator de crescimento endotelial (VEGF), agindo diretamente nas células endoteliais e na sua ligação com a matriz extracelular (YAO *et al.*, 2002). Porém, esse mecanismo atua no crescimento do tecido neoplásico, mas não afeta a vascularização já estabelecida no tumor (KOBAYASHI *et al.*, 1989, PIKE *et al.*, 1998, PIKE *et al.*, 1999). Experimento *in vivo* utilizando o gene da CRT e sua proteína recombinante em membrana corioalantóide de embrião de galinha indicou o efeito anti-angiogênico da proteína, mesmo em baixas concentrações (MOLINA *et al.*, 2005).

Já a proteína recombinante da molécula de superfície GP82 quando utilizada em uma linhagem tumoral de células de melanoma além de causar o rompimento do citoesqueleto de actina, também demonstrou alguns efeitos apoptóticos, como a exposição da fosfatidilserina, alterações morfológicas do núcleo, fragmentação do DNA, atividade de caspase-3 e aumento da despolarização das mitocôndrias. Em experimentos *in vivo*, foi demonstrado que animais em que as células tumorais foram injetadas, quando tratados com a proteína, apresentaram a diminuição do tumor quando comparados ao grupo tratado com salina e tiveram a sobrevida aumentada (ATAYDE *et al.*, 2008).

Sendo assim, demonstra-se os efeitos da proteína recombinante de *T. cruzi* rP21 na polimerização da actina e na atração de células tumorais, os quais podem estar relacionados com a inibição do crescimento do tumor sólido de Ehrlich. Apesar de não

termos conseguido responder a todas as perguntas que esse projeto propõe é importante que se busque novas moléculas com diferentes efeitos anti-tumorais.

Recentemente, grande parte dos estudos voltados para novos medicamentos ou novas técnicas com atividade anti-tumoral têm sido relacionadas à presença de nanopartículas, seja como a droga em si ou como sistema de entrega de drogas (ACHARYA & SAHOO, 2011). Também têm sido utilizados medicamentos já existentes no mercado para outros fins, na tentativa de encontrar uma droga a qual consiga eliminar os parasitas de doenças tropicais negligenciadas, como a Doença de Chagas, sem causar nenhum dano ao paciente (SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2012). Sabe-se que o parasita *T. cruzi*, assim como outros parasitas, apresenta propriedades anti-tumorais, seja pela utilização do próprio parasita, do extrato desse ou de proteínas a ele pertencente e, essa interação com o micro-ambiente tumoral demonstra que pode ocorrer uma relação de homeostase entre parasita-hospedeiro. Tendo em vista essa relação e as atividades biológicas apresentadas pela proteína recombinante rP21 de *T. cruzi* esta surge como um importante potencial biotecnológico nas pesquisas em busca de terapias anti-tumorais.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos podemos concluir que a rP21 não age de maneira citotóxica nas células de Ehrlich, assim como nos macrófagos peritoneais. Porém, acreditamos que a proteína recombinante possa agir no micro ambiente tumoral, inibindo a multiplicação das células tumorais pelo aumento da polimerização do citoesqueleto de actina, além de induzir o recrutamento de macrófagos. A diminuição de tumores sólidos de Ehrlich, observada em animais tratados com a rP21, corrobora com essa hipótese. Sugerindo assim que a proteína recombinante de *T. cruzi* rP21 apresente um potencial biotecnológico e sua interação com o micro ambiente tumoral possa influenciar inibindo o desenvolvimento do tumor.

8. REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S., SAHOO, S.K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 63, p. 170–183, 2011.
- AHMED, H., CHATTERJEE, B.P., DEBNATH, A.K. Interaction and *in vivo* growth inhibition of Ehrlich ascites tumor cells by jacalin. **J. Biosci.** v. 13, p. 419–424, 1988.
- ATAYDE, V., JASIULIONIS, M., CORTEZ, M., YOSHIDA, N., A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. **Melanoma Res.** v. 18, p. 172-183, 2008.
- ARAÚJO, K.C.L. Influência das proteínas arp2, septina 4 e 14 na Invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 59f. 2014.
- ARAÚJO, M.J.A.M., DUTRA, R.P., COSTA, G.C., REIS, A.S., ASSUNÇÃO, A.K.M., LIBÉRIO, S.A., MACIEL, M.C.G., SILVA, L.A., GUERRA, R.N.M., RIBEIRO, M.N.S., NASCIMENTO, F.R.F. Efeito do tratamento com própolis de Scaptotrigona aff. postica sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v. 20, p. 580-587, 2010.
- AZIM, H.A., KAMAL, N.S., AZIM JR, H.A. Bone metastasis in breast cancer: The story of RANK-Ligand. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute.** v. 24, p. 107–114, 2012.
- BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymol.** v.162, p. 327-334, 1988.
- BARRIAS, E.S., REIGNAULT, L.C., DE SOUZA, W., CARVALHO T.M.U. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. **PLoS ONE.** v. 5, p. 1–11, 2010.
- BATISTA, A.P.C., DA SILVA, T.G., TEIXEIRA, A.A.C., DE MEDEIROS, P.L., TEIXEIRA, V.W., ALVES, L.C., DOS SANTOS, F.A.B. Melatonin effect on the ultrastructure of Ehrlich ascites tumor cells, lifetime and histopathology in Swiss mice. **Life Sciences.** v. 93, p. 882–888, 2013.
- BATMONKH, Z., KALLINIKOVA, V.D., PAKHORUKOVA, L.V., KRAVTSOV, E.G., KARPENKO, L.P., DALIN, M.V. In vivo anticancer activity of lysates from *Trypanosoma cruzi* of different genetic groups. **Bull Exp Biol Med.** v. 142, p. 470-473, 2006.

BHATTACHARYYA, A., CHOUDHURI, T., PAL, S., CHATTOPADHYAY, S., DATTA, G.K., SA, G., DAS, T. Apoptogenic effects of black tea on Ehrlich's ascites carcinoma cell. **Carcinogenesis.** v.24, p.75–80, 2003

BRADFORD, M. M. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248, 1976.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.** v.27, p.347 – 382, 1973.

CABRAL, H., The tumoricidal effect of *Trypanosoma cruzi*: its intracellular cycle and the immune response of the host. **Med Hypotheses**, v. 54, p. 1-6, 2000.

CHEN, L., HE, Z., QIN, L., LI, Q., SHI, X., ZHAO, S., CHEN, L., ZHONG, N., CHEN, X. Antitumor Effect of Malaria Parasite Infection in a Murine Lewis Lung Cancer Model through Induction of Innate and Adaptive Immunity. **Plos one.** v. 6, p.e24407, 2011.

CLEGG, J., SMITHERS, S., TERRY, R. Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. **Int. J. Parasitol.** v. 1, p. 43–49, 1971.

DA SILVA, R.J., DA SILVA, M.G., VILELA, L.C., FECCHIO, D. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom. **Mediators Inflamm.** v. 11, p. 197-201, 2002.

DARANI, H.Y., YOUSEFI, M. Parasites and cancer: parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy. **Future Oncol.** v. 8, p. 1529–1535, 2012.

DE SOUZA. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cell Biol.** v. 86, p. 197 – 283, 1984.

DOS SANTOS, M.A., TEIXEIRA, F.B., MOREIRA, H.H.T., RODRIGUES, A.A., MACHADO, F.C., CLEMENTE, T.M., BRIGIDO, P.C., SILVA, R.T., PURCINO, C., GOMES, R.G.B., BAHIA, D., MORTARA, R.A., MUNTE, C.E., HORJALES, E., SILVA, C.V. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports.** v. 4, p. 4259, 2014.

DUNCAN, R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines, **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 688–701, 2006.

EEROLA, A.K., SOINI, Y., PAAKKO, P. A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size, low tumor stage, and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. **Clin. Cancer Res.** v. 6, p. 1875– 1881, 2000.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, **Nat. Rev. Cancer** v. 5, p. 161–171, 2005.

FERREIRA, E., DA SILVA, A.E., SERAKIDES, R., GOMES, M.G., CASSALI, G.D. Ehrlich tumor as model to study artificial hyperthyroidism influence on breast cancer. **Pathology – Research and Practice.** v. 203, p. 39–44, 2007.

FLORIDI, A., PAGGI, M.G., D'ATRI, S., DE MARTINO, C., MARCANTE, M.L., SILVESTRINI, B., CAPUTO, A. Effect of Lonidamine on the Energy Metabolism of Ehrlich Ascites Tumor Cells. **Cancer Research.** v. 41, p. 4661-4666, 1981

GAO, J.Q., OKADA, N., MAYUMI, T., NAKAGAWA, S. Immune Cell Recruitment and Cell-Based System for Cancer Therapy. **Pharmaceutical Research,** v. 25, 2008.

GRINDLAY, J. H. & WAUGH, J. M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. **AMA Arch. Surg.** v. 63, p. 288-297, 1951.

HALPERN, J.L., KILBARGER, A., LYNCH, C.C. Mesenchymal stem cells promote mammary cancer cell migration in vitro via the CXCR2 receptor. **Cancer Letters.** v. 308, p. 91–99, 2011.

HAN, Z., JING, Y., ZHANG, S., LIU, Y., SHI, Y., WEI, L. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. **Cell & Bioscience.** v. 2, p.8, 2012.

HAUSCHKA, T., SAXE, L.J., BLAIR, M. *Trypanosoma cruzi* in the treatment of mouse tumors. **J Natl Cancer Inst.** v. 7, p. 189-197, 1947.

HAUSCHKA, T., GOODWIN, M. *Trypanosoma cruzi* Endotoxin (KR) in the Treatment of Malignant Mouse Tumors. **Science.** v. 107, p. 600-602, 1948.

HIBBS JR, J.B., LAMBERT JR, L.H., REMINGTON, J.S. Resistance to murine tumors conferred by chronic infection with intracellular protozoa, *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. **J Infect Dis.** v. 124, p. 587-92, 1971.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <www.inca.com.br>. Acesso em: 11 de Abril de 2014.

JUNQUEIRA, C., SANTOS, L., GALVAO-FILHO, B., TEIXEIRA, S., RODRIGUES, F., DAROCHA, W., CHIARI, E., JUNGBLUTH, A., RITTER, G., GNJATIC, S., OLD, L., GAZZINELLI, R. *Trypanosoma cruzi* as an effective cancer antigen delivery vector. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 108, p. 19695-19700, 2011.

JUNQUEIRA, C., GUERRERO, A.T., GALVAO-FILHO, B., ANDRADE, W.A., SALGADO, A.P., CUNHA, T.M., ROPERT, C., CAMPOS, M.A., PENIDO, M.L., MENDONCA-PREVIATO, L., PREVIATO, J.O., RITTER, G., CUNHA, F.Q., GAZZINELLI, R.T. *Trypanosoma cruzi* adjuvants potentiate T cell-mediated immunity induced by a NY-ESO-1 based antitumor vaccine. **PLoS One**, v. 7, p. e36245, 2012.

KALLINKOVA, V.D., BORISOVA, E.N., PAKHORUKOVA, L.V. Immunization against *Trypanosoma cruzi* and tumor growth in mice. **Med. Parazitol. (Mosk.).** v. 4, p. 9–12, 2006.

KARIN, M. NF- κ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 1, p. a000141, 2009.

KIM, J.O., JUNG, S.S., KIM, S.Y., KIM, T.Y., SHIN, D.W., LEE J.H., LEE Y.H. Inhibition of Lewis Lung Carcinoma Growth by *Toxoplasma gondii* through Induction of Th1 Immune Responses and Inhibition of Angiogenesis. **J Korean Med Sci.** v. 22, p. S38-46, 2007.

KIM, J.O., JUNG, S.S., KIM, S.Y. Inhibition of Lewis lung carcinoma growth by *Toxoplasma gondii* through induction of Th1 immune responses and inhibition of angiogenesis. **J. Korean Med. Sci.** v. 22, S.38, 2007.

KLIEUEVA, N., ROSKIN, G. Cancerolytic substance of *Schizotrypanum cruzi*. **American Review of Soviet Medicine.** v.4, p.127-129, 1946.

KOBAYASHI, M., FITZ, L., RYAN, M., HEWICK, R.M., CLARK, S.C., CHAN, S., LOUDON, R., SHERMAN, F., PERUSSIA, B., TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J. Exp. Med.** v. 170, p. 827–845, 1989.

KREMENTSOV, N., *Trypanosoma cruzi*, cancer and the Cold War. **Hist Cienc Saude Manguinhos.** v. 16, p. 75-94, Jul. 2009.

KURIAN, A.W., MITANI, A., DESAI, M., YU, P.P., SETO, T., WEBER, S.C., OLSON, C., KENKARE, P., GOMEZ, S.L., DE BRUIN, M.A., HORST, K., BELKORA, J., MAY, S.G., FROSCH, D.L., BLAYNEY, D.W., LUFT, H.S., DAS, A.K. Breast Cancer Treatment Across Health Care Systems. Linking Electronic Medical Records and State Registry Data to Enable Outcomes Research. **Cancer.** v. 120, p. 103-11, 2014.

LOPEZ, N.C., VALCK, C., RAMIREZ, G., RODRIGUEZ, M., RIBEIRO, C., ORELLANA, J., MALDONADO, I., ALBINI, A., ANACONA, D., LEMUS, D., AGUILAR, L., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 4, p. e730, 2010.

LOPEZ, N.C., VALCK, C., RAMIREZ, G., RODRIGUEZ, M., RIBEIRO, C., ORELLANA, J., MALDONADO, I., ALBINI, A., ANACONA, D., LEMUS, D., AGUILAR, L., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 4, p. e730, 2010.

MACHADO, F.C. Galectina-3, AFAP1-L1 e WASP na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi* e caracterização biológica da proteína P21-His₆. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 65f. 2014.

MANQUE, P.M., NEIRA, I., ATAYDE, V.D., CORDERO, E., FERREIRA, A.T., FRANCO DA SILVEIRA, J., RAMIREZ, M., YOSHIDA, N. Cell adhesion and Ca²⁺ signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stage-specific surface molecule gp82. **Infect. Immun.** v. 71, p.1561 – 1565, 2003.

MARTINS, F.A. Estudos biológicos da P21 de *Trypanosoma cruzi* e seu efeito na multiplicação parasitária. **Monografia (Graduação)**. Instituto de Biologia – Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado. 52f, 2013.

MAURIZ, J.L., LINARES, P., GONZÁLEZ, P. CULEBRAS, J.M. Tratamiento antiangiogénico del câncer. **Cir Esp.** v.78, p.3-11, 2005.

MIYAHARA, K., YOKOO, N., SAKURAI, H., IGARASHI, I., SAKATA, Y., YOSHIDA, Y., SAITO, A., HIROSE, T., SUZUKI, N. Antitumor activity of Toxoplasma lysate antigen against methylcholanthrene-induced tumor-bearing rats. **J Vet Med Sci.** v.54, p. 221-8, 1992.

MOLINA, M.C., FERREIRA, V., VALCK, C., AGUILAR, L., ORELLANA, J., ROJAS, A., RAMIREZ, G., BILLETTA, R., SCHWAEBLE, W., LEMUS, D., FERREIRA, A. An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. **Molecular & Biochemical Parasitology.** v.140, p. 133–140, 2005.

MULTHOFF, G., RADONS, J., VAUPEL, P. Critical Role of Aberrant Angiogenesis in the Development of Tumor Hypoxia and Associated Radioresistance. **Cancers.** v.6, p.813-828, 2014.

MURDOCH, C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. **Immunological Reviews.** v. 177, p. 175-84, 2000.

O'BRIEN, J., WILSON, I., ORTON, T., POGNAN, F. Investigation of Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry.** v 267, p. 5421-6, 2000.

OLIVEIRA, E., LEITE, M., MIRANDA, J., ANDRADE, A., GARCIA, S., LUQUETTI, A., MOREIRA, H. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Carcinogenesis.** v.22, p.737-740, 2001.

OLORIS, S.C.S., DAGLI, M.L.Z., GUERRA, J.L. Effect of h-carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Sciences.** v.71, p. 717–724, 2002.

OSINAGA, E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. **IUBMB Life.** v. 59, p. 269-273, 2007.

PAPACHRISTOU, D.J., BASDRA, E.K., PAPAVASSILIOU, A.G. Bone Metastases: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Interventions. **Medicinal Research Reviews.** v. 32 p. 611-636, 2012.

PIDHERNEY, M.S., ALIZADEH, H., STEWART, G.L., MCCULLEY, J.P., NIEDERKORN, J.Y. *In vitro* and *in vivo* tumoricidal properties of a pathogenic/ free-living amoeba. **Cancer Lett.** v. 72, p. 91–98, 1993.

PIKE, S.E., YAO, L., JONES, K.D., CHERNEY, B., APPELLA, E., SAKAGUCHI, K., NAKHASI, H., TERUYA-FELDSTEIN, J., WIRTH, P., GUPTA, G., TOSATO, G. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. **J. Exp. Med.** v. 188, p. 2349–2356, 1998.

PIKE, S.E., YAO, L., SETSUDA, J., JONES, K.D., CHERNEY, B., APPELLA, E., SAKAGUCHI, K., NAKHASI, H., ATREYA, C.D., TERUYA-FELDSTEIN, J., WIRTH, P., GUPTA, G., TOSATO, G. Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. **Blood.** v.94, p. 2461–2468, 1999.

PINTO, A.V., MARTINS, P.R., ROMAGNOLI, G.G., CAMPANELLI, A.P., TEREZAN, A.P., FILHO, E.R., FERREIRA DA EIRA, A., KANENO, R. Polysaccharide fraction of Agaricus brasiliensis avoids tumor-induced IL-10 production and changes the microenvironment of subcutaneous Ehrlich adenocarcinoma. **Cell Immunol.** v. 256, p. 27-38, 2009.

PLUMELLE, Y., GONIN, C., EDOUARD, A. Effect of *Strongyloides stercoralis* infection and eosinophilia on age at onset and prognosis of adult T-cell leukemia. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 107, p. 81–87, 1997.

POLVERINI, P.J. How the extracellular matrix and macrophages contribute to angiogenesis-dependent diseases. **Eur J Cancer.** v. 32A, p. 2430–2437, 1997.

RAMIREZ, G., VALCK, C., AGUILAR, L., KEMMERLING, U., LOPEZ-MUNOZ, R., CABRERA, G., MORELLO, A., FERREIRA, J., MAYA, J.D., GALANTI, N., FERREIRA, A. Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth. **Mol Immunol.** v. 52, p. 133-140, 2012.

RODRIGUES, A.A., CLEMENTE, T.M., SANTOS, M.A., MACHADO, F.C., GOMES, R.G.B., MOREIRA, H.H.T., CRUZ, M.C., BRIGIDO, P.C., DOS SANTOS, P.C.F., MARTINS, F.A., BAHIA, D., MARICATO, J.T., JANINI, L.M.R., REBOREDO, E.H., MORTARA, R.A., SILVA, C.V.A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **Plos One.** v.7, p.e51384, 2012.

ROLÓN, M., VEGA, C., ESCARIO, J.A., GÓMEZ-BARRIO, A. Development os resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research.** v. 99, p. 103-7, 2006.

SADZUKA, Y., HIROTA, S., SONOBE, T., Intraperitoneal administration of doxorubicin encapsulating liposomes against peritoneal dissemination. **Toxicol Lett.** v. 116, p. 51-59, 2000.

SALOMONNSEN, E., STACER, A.C., EHRLICH, A., LUKER, K.E., LUKER, G.D. Imaging CXCL12-CXCR4 Signaling in Ovarian Cancer Therapy. **Plos One.** v. 8, p.e51500, 2013.

SHEKLAKOVA, L., KALLINIKOVA, V., KARPENKO, L. Genetic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* and its direct anticancer effect in cultured human tumor cells. **Bull Exp Biol Med.** v. 135, p. 89-92, 2003.

SILVA, A.E., SERAKIDES, R., FERREIRA, E. Effect of hypothyroidism on the solid form of Ehrlich tumor in intact or castrated adult female mice. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** v. 48, p. 867–874, 2004.

SILVA, C.V., KAWASHITA, S.Y., PROBST, C.M., DALLAGIOVANNA, B., CRUZ, M.C., SILVA, E.A., SOUTO-PADRÓN, T.C.B.S., KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S., BRIONES, M.R.S., ANDREWS, N.W., MORTARA, R.A. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection.** v. 11, p. 563-570, 2009.

SIQUEIRA-NETO, J.L., MOON, S., JANG, J., YANG, G., LEE, C., MOON, H.K., CHATELAIN, E., GENOVESIO, A., CECHETTO, J., FREITAS-JUNIOR, L.H. An Image-Based High-Content Screening Assay for Compounds Targeting Intracellular Leishmania donovani Amastigotes in Human Macrophages. **Plos neglected tropical diseases.** v.6, p. e1671, 2012.

SOUZA, W., CARVALHO, T. M. U., BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International Journal of Cell Biology.** v. 2010, p. 1-18, 2010.

TERLIKOWSKI, S., SULKOWSKA, M., NOWAK, H.F., The effect of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on Ehrlich ascites tumor growth. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.** v. 21, p. 87-92, 2002.

YAMAGUCHI, H., CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1773, p. 642–652, 2007.

YAO, L., SANDRA, E., PIKE, S.E., TOSATO, G. Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function. **J. Leukoc. Biol.** v.71, p. 47–53, 2002.

YIN X.Y., LU M.D., LAI Y.R., LIANG L.J., HUANG J.F. Prognostic significances of tumor-infiltrating S-100 positive dendritic cells and lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma. **Hepatogastroenterology.** v. 50, p.1281–1284, 2003.

ZENINA, A., KRAVTSOV, E., TSETSEGSAIKHAN, B., YASHINA, N., DALIN, M., KARPENKO, L., SHEKLAKOVA, L., KALLINIKOVA, V. The study of immunological component in antitumor effect of *Trypanosoma cruzi*. **Bull Exp Biol Med.** v. 145, p. 352-354, 2008.

ZHIGUNOVA, A., KRAVTSOV, E., YASHINA, N., DALIN, M., KARPENKO, L. Effects of specific antibodies and immunocompetent cells on tumor growth in passive transfer experiment. **Bull Exp Biol Med.** v. 154, p. 762-764, 2013.

APÊNDICE A

----- Mensagem encaminhada -----

De: "scientificreports@nature.com" <scientificreports@nature.com>

Para: silva_cv@yahoo.com.br

Enviadas: Terça-feira, 6 de Janeiro de 2015 16:32

Assunto: Manuscript SREP-14-11560A peer review

Dear Prof Silva,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Trypanosoma cruzi P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy" to Scientific Reports. I am pleased to inform you that, after an initial assessment, your manuscript will be peer reviewed. We are now in the process of contacting referees.

We will contact you after we have received our referees' comments.

Best regards,

Manuscript Administration
Scientific Reports
4 Crinan Street
London N1 9XW
E-mail: scientificreports@nature.com

This email has been sent through the NPG Manuscript Tracking System NY-610A-NPG&MTS

***Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic
cardiomyopathy therapy**

^{1,#}Aline Alves da Silva, ^{1,#}Bruna Cristina Borges, ^{1,2,#}Fabrício Castro Machado, ^{1,#}Thaise Lara Teixeira, ^{1,#}Samuel Cota Teixeira, ¹Adele Aud Rodrigues, ¹Ana Flávia Oliveira Notário, ¹Simone Ramos Deconte, ³Daiana Silva Lopes, ³Veridiana Melo Rodrigues Ávila, ¹Fernanda de Assis Araújo, ¹Tatiana Carla Tomiosso, ¹Marcelo José Barbosa da Silva, ^{1,*}Claudio Vieira da Silva

¹Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil.

²Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil.

³Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil.

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author:

Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Laboratório de Tripanosomatídeos

Disciplina de Imunologia - Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade Federal de Uberlândia

Av. Amazonas - Bloco 6T sala 07

Campus Umuarama 38400-902

Uberlândia, MG Brasil

Phone:+55 34 3218-2549

silva_cv@yahoo.com.br

Abstract

Chagas disease, which is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is an important cause of cardiomyopathy in Latin America. It is estimated that 10%–30% of all infected individuals will acquire chronic chagasic cardiomyopathy (CCC). The etiology of CCC is multifactorial and involves parasite genotype, host genetic polymorphisms, immune response, signaling pathways and autoimmune progression. Herein we verified the impact of the recombinant form of P21 (rP21), a secreted *T. cruzi* protein involved in host cell invasion, on progression of chronic inflammatory processes in a polyester-induced inflammation model using chemotaxis, angiogenesis and actin polymerization assays. Results indicate that rP21 can recruit immune cells and decrease blood vessels compared to controls *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, rP21 induced actin polymerization. *T. cruzi* P21 could be a potential target for development of P21 antagonist compounds to treat symptomatic CCC.

Chagas disease, which is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is an important cause of cardiomyopathy in Latin America. It is estimated that 10%–30% of all infected individuals will acquire chronic chagasic cardiomyopathy (CCC). This represents anywhere between 1.6 to 5.4 million CCC patients in Latin America¹. CCC has been shown to cause social and economic burdens in endemic areas because of increased health care costs². An estimated 20.000 deaths occur annually in endemic countries due to complications of CCC¹. The prognosis for chagasic patients is rather bleak. In fact, CCC has been reported to be the main prognostic mortality factor among patients with heart failure of various etiologies^{1,2}.

The etiology of CCC is multifactorial and involves parasite genotype^{3,4}, host genetic polymorphisms⁵⁻⁹, immune response¹⁰⁻¹³, signaling pathways¹⁴ and autoimmunity^{15,16}. An intriguing question remains unanswered: could trypanosome-derived components play an active role in CCC onset rather than serving as passive targets for the host immune response? In this sense, trapped intracellular parasites may continue to secrete proteins that can enter the extracellular space after plasma membrane wounding and/or lysis and influence disease progression. Herein we verified the impact of the recombinant form of P21 (rP21), a secreted *T. cruzi* protein involved in host cell invasion¹⁷⁻¹⁹, on progression of chronic inflammatory processes in a polyester-induced inflammation model.

Results and Discussion

Our previous studies using the recombinant form of *T. cruzi* P21 showed that this secreted protein is involved in host cell invasion¹⁷. In addition, rP21 enhanced macrophage phagocytosis and actin polymerization by binding to the CXCR4 receptor¹⁸.

The ability of rP21 to bind to CXCR4 indicated possible chemotaxis activity. We observed that rP21 attracted neutrophils *in vitro* (Figure 1A). To assess whether rP21 has chemoattractive activity *in vivo*, we injected it intraperitoneally into mice and observed similar cell recruitment over time (Figure 1B). Phenotypic cell identification showed that the infiltrated was composed mainly of neutrophils at earlier time points, followed by lymphocytes and macrophages at later time points (Figure 1C). Similar results were obtained after injection of 4% thioglycolate (data not shown). rP21 attracted peritoneal murine macrophages in a trans-well system through a polycarbonate

membrane over a thin layer of extracellular matrix. Detection of migrating cells was performed via crystal violet staining (Figure 1D, E).

The literature has shown that the inflammatory process that characterizes CCC is accentuated during the acute phase of the disease. Although it may be clinically silent after the acute phase, inflammation is continuously present in patients with indeterminate and chronic phases^{20,21}. Moreover, trypanosome antigens and/or its genomic material are found in inflammatory foci²²⁻²⁶. These observations provide a basis to propose a role for P21 regarding the onset and maintenance of chagasic heart inflammation.

We observed high N-acetylglucosaminidase levels in rP21-treated polyester sponge implants (Figure 2A, B), indicating that rP21 not only recruits, but also activates macrophages. A high rP21 dose impacted myeloperoxidase expression (Figure 2A, B). This observation corroborated our previous results on the ability of rP21 to recruit immune cells.

In vitro and *in vivo* studies have shown the presence of mast cells associated with cardiac *T. cruzi* infection²⁷⁻²⁹. In the present study, we observed rP21-triggered mast cells in sponge implants (Figure 2C), suggesting a potential role of *T. cruzi* P21 in promoting recruitment of mast cells to damaged cardiac tissue and upregulating the inflammatory process.

We observed a significant decrease in hemoglobin content (Figure 3A), suggesting a potential anti-angiogenic role of rP21. To confirm this hypothesis, we measured the number of blood vessels on histological preparations. Sponge implants treated with different rP21 concentrations showed a decreased number of blood vessels compared to the control (Figure 3B). We also treated a murine endothelial cell line derived from thymus hemangioma (tEnd) with similar rP21 concentrations and observed inhibition of blood vessel formation *in vitro* (Figure 3 C-F). This activity was not due to cell adhesion impairment to the matrix gel or cell toxicity (Figure 3 G, H).

Functional and structural microvascular abnormalities occur in CCC^{30,31}. Consequently, vasospasms, decreased blood flow, focal ischemia, platelet thrombi, increased platelet aggregation, and elevated levels of thromboxane A-2 and endothelin-1 are frequently observed³²⁻³⁵. As such, P21 could impact microvascular ischemia, which is believed to amplify chronic inflammatory aggression toward myocardial tissue³⁶.

We previously observed that rP21 induced actin polymerization by binding to the CXCR4 receptor¹⁸. Herein we evaluated whether rP21 directly induced actin polymerization using a cell free biochemical assay (Figure 3I). The ability of rP21 to induce actin polymerization suggests that the native protein may induce polymerization in infected cells to restrict intracellular parasites from migrating. In this sense, native P21 may contribute to the establishment of chronic infection without a parasitological cure.

rP21 pretreatment with polymixin B showed similar activity (data not shown), as previously observed¹⁸.

CCC treatment regimens include β-blockers, diuretics, angiotensin-enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers and amiodarone¹. While parasitological treatment is still a matter of debate^{37,38}, researchers have studied host defense components such as NADPH oxidase³⁹ and transforming growth factor beta signaling⁴⁰ and approaches based on treatment with granulocyte colony-stimulating factor have been described⁴¹. All of these therapeutic schemes have shown promising results.

We propose a novel line of investigation that targets components of parasitic origin that could have an impact on CCC symptoms. *T. cruzi* P21 may be a potential target for developing antagonist compounds to treat symptomatic CCC.

Experimental procedures

Animals and ethics

Six- to eight-week-old male C57BL/6 and BALB/c mice were maintained under standard conditions on a 12-h light-dark cycle in a temperature controlled setting (25 °C) with food and water *ad libitum*. Maintenance and care of animals complied with the guidelines of the Laboratory Animal Ethics Committee from the Universidade Federal de Uberlândia. Animal euthanasia was performed based on international welfare grounds according to the American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia. This study was approved by the ethics committee for animal research at Universidade Federal de Uberlândia.

Cell culture

Murine endothelial cell lines derived from thymus hemangioma (tEnd)⁴⁷ were cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% bovine fetal serum, 2 mM l-

glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 1 mM non-essential amino acids, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin and incubated at 37 °C and 5% CO₂.

Cell viability

The viability of cultured tEnd cells treated with rP21 was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. Cells were seeded at 1.5×10^4 cells/well in 96-well microplates. After adhesion, cells were treated with different concentrations of rP21 or culture medium (control group) for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After 24 h, cells were incubated with 5 mg/mL MTT for 3 h at 37 °C. Formazan crystals resulting from MTT reduction were dissolved by addition of 100 µL of PBS containing 10% SDS and 0.01 M HCl (18 h, 37 °C and 5% CO₂). Absorbance (570 nm) was read on a multiwell scanning spectrophotometer (Thermo Scientific).

rP21 purification

rP21 (GenBank: EU004210.1) was purified as previously described^{17,19}. The quality of purification was demonstrated by SDS-PAGE.

***In vitro* and *in vivo* chemotaxis assays**

The *in vitro* chemotaxis assay for peritoneal macrophages was performed in a trans-well system through a polycarbonate membrane with a defined pore size of 8 µm (Chemicon Cell Invasion Assay Kit, EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemania). Peritoneal macrophages from BALB/c mice were seeded at 10^6 in the top of the insert in serum-free media, while medium with FBS as a positive control, 50 µg/mL of rP21 or serum-free media as a negative control was added in the bottom well. Cells were incubated for 72 hours. Migratory cells were stained, photographed and counted.

For neutrophil chemotaxis, a Boyden chamber assay was used, consisting of upper and lower chambers separated by a polycarbonate membrane with an 8-µm pore. Neutrophils were extracted from C57BL/6 bone marrow using ficoll to separate them from other cells. Some of the cells were treated with pertussis toxin (G-protein coupled receptor inhibitor) for 1 hour. Treated and non-treated cells were placed in the upper chamber. In the lower chamber, only media, rP21 or macrophage inflammatory protein (MIP-2), a chemotaxis positive control, were added. After 1 hour, the membrane was removed, fixed and colored with panoptic dyes. Cells that migrated were counted using an optical microscope.

In vivo, C57BL/6 mice received two different intraperitoneal treatments: PBS and 40 µg/mL rP21. Animals were euthanized at intervals of 6 hours, 24 hours and 72 hours. Peritoneal lavage was performed using 4 mL PBS, with 2 mL collected. Total leukocyte recruitment was quantified in a Neubauer chamber. Fifty microliters of each sample was placed on a microscope slide, dried and fixed in pure methanol (Synth A1085.01.BJ) for 5 minutes and then subjected to Giemsa stain (Sigma) at a concentration of 1:20 diluted in water for 15 minutes. Analysis was performed by optical microscopy wherein 100 cells were counted and differentiated between lymphocytes, monocytes and polymorphonuclear cells.

Contents from washing the peritoneal cavities of the mice were centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 mL of 4% formaldehyde. After fixation for 2 hours, samples were centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes and resuspended in PBS for subsequent flow cytometry (BD FacsCanto II) to evaluate the size and granularity of cells and to separate populations of monocytes, polymorphonuclear cells and lymphocytes.

Polyester chronic inflammation induction and rP21 treatment scheme

A polyester sponge disc with a 1.2 cm diameter (Vitafoam Ltd.) was stored in 70% ethanol v/v prior to deployment for at least 24 hours and subsequently boiled in distilled water for 30 minutes^{43,44}.

To facilitate spongy matrix insertion, C57BL/6 mice were divided into groups of 10 animals for biochemical analysis and 5 animals for histological analysis, treated with and without rP21. The animals were anesthetized intraperitoneally with ketamine-xylazine (Syntec) (60 mg-4 mg/kg) and subjected to trichotomy and antisepsis in the dorsal region with alcohol 70% v/v. An approximately 10 mm dorsal midline incision was made and dilatation was performed in the subcutaneous cranial direction. The sponge disc was introduced by midline incision in the interscapular region. Incisions were closed with a Donati suture using nylon 3.0. After recovery from anesthesia, animals were placed in individual cages with food and water ad libitum⁴³. Treatments were injected into the sponge every 72 hours and analyzed during the chronic (9 days) phase of inflammation.

Hemoglobin content

Determination of the intra-implant hemoglobin content was done using Drabkin's reagent, which was developed in 1932 and adapted as an desvascularization index^{45,46}.

Implants were removed and masses determined 9 days post-implantation. Samples that showed macroscopic bleeding or infection were excluded from analysis. Each implant was homogenized (Tekmar TR-10, Ohio, USA) in 2 mL of a hemoglobin-specific chromogen reagent (Drabkin kit, Labtest) and added to 2 mL Eppendorf tubes. Samples were centrifuged at 4°C for 30 minutes at 12,000 rpm and homogenates were filtered through 0.22 µm filters (Millipore). Spectrophotometric analysis was performed on an ELISA reader at a wavelength of 540 nm using 96-well plates. The hemoglobin concentration of each sample was calculated from a known standard curve (diagnostic analyses) and the results were expressed as hemoglobin concentration (micrograms) per milligram wet weight of the implant.

Cellular infiltration by myeloperoxidase activity (MPO)

After determining the hemoglobin content, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 2 mL sodium phosphate buffer (pH 5.4). Samples were homogenized by vortexing for 30 seconds, and 300 µL was transferred to Eppendorf tubes and supplemented with 600 µL of 0.5% w/v HTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, Sigma) diluted in phosphate buffer (pH 5.4). After further vortex homogenization, the samples were frozen for subsequent dosing. After freezing, samples were thawed and centrifuged at 10,000 g for 10 minutes at 4 °C and the supernatant was used in an enzymatic assay.

The enzymatic assay was performed in 1.5 ml Eppendorf tubes, with reagents added in the following order: 100 µL of 0.003% hydrogen peroxide and 100 µL TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma) at 4 mM diluted in DMSO (dimethyl sulfoxide, Merck). A total of 200 µL of the sample supernatant was added for 1 minute. The reaction was stopped by adding 100 µL of 4M H₂SO₄ (sulfuric acid, Merck). Then 200 µL was added to the 96-well plate and spectrophotometric analysis was performed at a wavelength of 450 nm. Results are expressed as the MPO index (absorbance/mg wet weight of the implant).

Cellular infiltration activity of N-acetylglucosaminidase (NAG)

After using the sponge for hemoglobin assessment, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 2.0 mL 0.9% saline with 0.1% Triton X-100 (Promega). Samples were homogenized by vortexing and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was used in the assay.

A total of 100 µL of the samples was added to a 96-well plate in duplicate. An additional 100 µL of substrate (p-nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide, Sigma) diluted in citrate buffer/phosphate pH 4.5 was added to the samples and incubated at 37 °C for 30 minutes. Last, 100 µL of 0.2M glycine buffer pH 10.6 was added. Absorbance was measured using a spectrophotometry ELISA reader at a wavelength of 400 nm. NAG activity of the implant was calculated from a standard curve of p-nitrophenol evaluated simultaneously. P-nitrophenol is the product of the reaction between the chromogen p-nitrophenol-N-acetyl-glucosamine and beta-D-N-acetylglucosaminidase (NAG). Results are expressed as nmol mL⁻¹/mg wet weight of the implant.

Histological analyses

Sponges removed only for histological processing were fixed in Metacarn buffer (60% methanol, 30% chloroform, 10% acetic acid) for 3 hours in the refrigerator. Sponges were then prepared for inclusion in ethyl alcohol PA for 30 minutes with 4 washes in xylene, followed by an additional 30 minutes incubation and three washes. Sponges were embedded in paraffin I, II and III for 90 minutes each. The blocks were processed for hematoxylin and eosin (HE) and toluidine blue staining. Images were obtained in the Histology Laboratory at the Federal University of Uberlândia with a Leica DM500 microscope coupled to Las Ez camera and software.

Angiogenesis assay

The influence of rP21 on endothelial cell tube formation was evaluated by Matrigel tube formation assays. Experiments were performed as described⁴⁷. tEnds cells (2×10^5 cells/well) were preincubated with 10, 40 and 80 µg/mL of rP21 or culture medium (control group) for 30 min at room temperature and plated on 24-well plates previously coated (60 min at 37 °C) with 250 µL of 5.25 mg/mL Matrigel (BD Bioscience) in a total volume of 200 µL culture medium supplemented with bFGF (30 ng/mL). After 18 h, cells were photographed under a microscope at $\times 20$ magnification.

Polymerization of actin cytoskeleton assay

An actin polymerization biochem kit (muscle actin) (Cytoskeleton, Inc.) was used to verify the effect of rP21 on polymerization of actin monomers. The kit contains actin monomers and the fluorophore pyrene. Pyrene becomes fluorescent if it binds to polymerized actin.

Statistical analysis

Significant differences were determined by one-way ANOVA performed according to the VassarStats program (Richard Lowry 1998–2006) available at <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>, or using the GraphPad Prism program, version 5.01 for Student's t-test analysis. Differences were considered significant when $p<0.05$. All experiments were performed 4 to 8 times in triplicate.

References

1. Carvalho, A. C. C. *et al.* Cell therapy in Chagas Disease. *Interd. Perspc. Infect. Dis.* **2009**, 1-6 (2009).
2. Abuhad A, Segre C.A.W, Demarchi L.M.M.F, Aiello V. Case 06/2005 – progressive heart failure in a 65-year-old man with permanent cardiac pacemaker. *Arq. Bras.Ccardiol.* **85**, 437-43(2005).
3. Ramírez, J. D. *et al.* Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **4**, 1-9 (2010).
4. Ferrer, M. F., Pascuale, C. A., Gomez, R. M. DTU I isolates of *Trypanosoma cruzi* induce upregulation of Galectin-3 in murine myocarditis and fibrosis. *Parasitol.* **141**, 849-858 (2014).
5. Cruz-Robles, D. *et al.* Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. *Immunol. Invest.* **38**, 231-239 (2009).
6. Boldt, A. B., Luz, P. R., Messias-Reason, I. J. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. *Clin. Immunol.* **140**, 63-70 (2011).
7. Henao-Martínez , A. F., Schwartz, D. A., Yang, I. V. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **106**, 521-527 (2012).
8. Pissetti C.W. *et al.* Association between the lymphotoxin-alpha gene polymorphism and chagasic cardiopathy. *J Interf. Cytok. Res.* **33**, 130-135 (2013).

9. Frade A.F *et al.* Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect. Dis.* **13**, 587 (2013).
10. Lula J.F. *et al.* Plasma concentrations of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and Fas Ligand/CD95L in patients with Chagas cardiomyopathy correlate with left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail.* **11**, 825-831 (2009).
11. Silverio, J. C. Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int. J. Exp. Pathol.* **91**, 72-86 (2010).
12. Cutrullis, R. A. Elevated serum levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with progressive chronic cardiomyopathy in patients with Chagas disease. *Plos ONE.* **8**, 1-9 (2013).
13. Sousa *et al.*, Plasma Cytokine Expression Is Associated with Cardiac Morbidity in Chagas Disease, *PLoS ONE* **9**, (2014).
14. Roman-Campos D *et al.* Novel insights into the development of chagasic cardiomyopathy: role of PI3Kinase/NO axis. *Int J Cardiol.* **167**, 3011-20 (2013).
15. Macedo L.G.R *et al.* Rationale and Design of a Prospective Study to Assess the Effect of Microcirculatory Antiplatelet and Vasodilation Therapy in Patients with Chronic Chagas Disease and Coronary Microvascular Disease. *Rev Bras Cardiol Invasiva.* **20**, 82-8 (2012).
16. Nunes, M. C. *et al.* Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 767-776 (2013).
17. Silva, C. V. *et al.* Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes Infect.* **11**, 563-570 (2009).
18. Rodrigues, A. A. *et al.* A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. *Plos ONE.* **7**, 120-122 (2012).
19. Dos Santos, M. A. *et al.* A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. *Sci. Rep.* **4**, 42-59 (2014).
20. Pereira-Barretto, A. C. *et al.* Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am. Heart J.* **111**, 307-312 (1986).

21. Carrasco-Guerra, H. A. *et al.* Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. *Am. Heart J.* **113**, 716-724 (1987).
22. Jones E. M. *et al.* Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**, 348-357 (1993).
23. Bellotti, G. *et al.* In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am. Heart J.* **131**, 301-307 (1996).
24. Zhang, L., Tarleton, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* **180**, 480-486 (1999).
25. Palomino, S. A., Aiello, V. D., Higuchi, M. L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **94**, 571-579 (2000).
26. Tarleton, R. L. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* **31**, 550-554 (2001).
27. Almeida, H. O., Pereira, F. E. & Tafuri, W.L. Mast cells in Chagas' chronic cardiopathy. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **17**, 5-9 (1975).
28. Postan, M., Correa, R., Ferrans, V. J., Tarleton, R. L. *In vitro* culture of cardiac mast cells from mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **105**, 251-257 (1994).
29. Meuser-Batista, M., Correa, J. R., Soares, M. J. & Henriques-Pons, A. Isolation of cardiac mast cells in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Cell.* **40**, 309-316 (2008).
30. Punukollu, G. *et al.* Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int. J. Cardiol.* **115**, 279-283 (2007).
31. Marin-Neto, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* **115**, 1109-1123 (2007).
32. Rossi, M. A., Goncalves, S., Ribeiro-dos-Santos, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am. J. Pathol.* **114**, 209-216 (1994).
33. Rossi, M. A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. *Am. Heart J.* **120**, 233-236 (1990).

34. Tanowitz, H. B. *et al.* Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**, 274-281 (1990).
35. Tanowitz, H. B. *et al.* Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Parasitol.* **82**, 124-130 (1996).
36. Biolo, A., Ribeiro, A. L., Clausell, N. Chagas Cardiomyopathy—Where Do We Stand After a Hundred Years? *Prog. Cardiovasc. Dis.* **52**, 300–316 (2010).
37. Guedes P.M..M. *et al.* Antiparasitcal chemotherapy in Chagas' disease. *Trop. Med. Int. Health.* **17**, 1057–1065 (2012).
38. Viotti R.J. *et al.* Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. *Heart.* **90**, 655–660 (2004).
39. Dhiman M. *et al.* Cardiac-oxidized antigens are targets of immune recognition by antibodies and potential molecular determinants in Chagas disease pathogenesis. *PLoS ONE.* **7**, e28449 (2012).
40. de Oliveira RB, Troncon LE, Dantas RO, Menghelli UG. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Am. J. Gastro-enterol* **93**, 884-9 (1998).
41. Macambira SG, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. *FASEB J.* **23**, 3843–3850 (2009).
42. Bussolino, F. *et al.* Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. *J. Immunol.* **147**, 2122–2129 (1991).
43. Andrade, S. P., Fan, T. P .D, Lewis, G. P. Quantitative in vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br. J. Exp. Pathol.* **68**, 755-766 (1987).
44. Andrade SP, Ferreira MA. The sponge implant model of angiogenesis. *Meth. Mol Biol.* **467**, 295-304 (2009).
45. Plunkett, M. L., Hailey, J. A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Lab. Invest.* **62**, 510-517 (1990).
46. Hu, D. E., Hiley, C. R., Smither, R. L., Gresham, G. A., Fan, T. P. D. Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. *Lab. Invest.* **72**, 601 (1995).

47. Achê, D. C. *et al.* Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: Inhibition of cell adhesion and angiogenesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 445–453 (2014).

Acknowledgments

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - Processes numbers: APQ-00305-12; APQ-01855-13); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Process number: 23038.005295/2011-40) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Process number: 444862/2014-5). This manuscript has been edited by native English-speaking experts from **BioMed Proofreading LLC**.

Author contribution statement

AAS, BCB, FCM, TLT, SCT: performed the biological experiments, acquired, analyzed and interpreted the data and drafted the manuscript.

AAR, AFON, SRD, DSL: performed experiments.

VMRA, FAA, TCT, MJBS, CVS: designed the biological experiments, drafted the manuscript, critically revised the manuscript and contributed to its intellectual content.

Additional information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Figure legends

Fig. 1: rP21 and chemotaxis. A. Chemotaxis of neutrophils *in vitro* was determined using the Boyden chamber assay. Cells were placed in the upper chamber and medium, rP21 and the positive control MIP-2 were placed in the lower chamber. B. To evaluate chemotaxis *in vivo*, 40 µg/mL rP21 was injected into the peritoneal cavity of C57BL/6 mice. Results show the capacity of the protein to recruit neutrophils at different exposure times. C. Flow cytometry demonstrated a prevalence of neutrophils at early time points, while infiltrated lymphocytes and macrophages were predominant at later time points, suggesting an exchange of the population recruited. D and E. In a trans-well

system through a polycarbonate membrane, the protein showed chemoattractive properties in murine peritoneal macrophages. Medium with FBS served as a positive control. Arrows indicate the presence of recruited macrophages (*p<0.05; **p<0.001; ***P<0.0001).

Fig. 2: rP21 recruited immune cells, as determined by treating polyester sponge discs with different concentrations of rP21. A and B. High levels of N-acetylglucosaminidase and myeloperoxidase after treatment indicate that rP21 not only recruits but also activates macrophages and neutrophils. C. Mast cells were also recruited. D and E. Histological images show that the sponges treated with rP21 had a lower number of blood vessels (arrows). (*p<0.05; **p<0.001; ***P<0.0001).

Fig. 3: rP21 inhibited angiogenesis. A. Hemoglobin concentrations (g/mL) per mg wet weight of sponge were obtained. There was a significant reduction in hemoglobin content with increasing rP21 concentrations, suggesting an anti-angiogenic effect. B. There was decrease in blood vessels present in the groups treated with rP21. C. tEnd cells preincubated with medium were used as controls. D. tEnd cells treated with 10 μ g/mL, E. 40 μ g/mL, and F. 80 μ g/mL of rP21. After 18 h, cells were observed under the microscope at x20 magnification and photographed. G. Despite inhibiting vessel formation, the protein was not cytotoxic. H. Also, it did not affect cell adhesion. I. rP21 can polymerize the actin cytoskeleton in a dose-dependent manner. PBS with cytochalasin B (cyto B - 1 μ g/mL) showed that fluorescence was not observed when actin polymerization was inhibited (*p<0.05; **p<0.001; ***P<0.0001).

