

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

ATIVIDADE ANTIANGIÔNICA DA FORMA RECOMBINANTE DA
PROTEÍNA 21 DE *Trypanosoma cruzi*

Samuel Cota Teixeira

Uberlândia
Julho – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

ATIVIDADE ANTIANGIÔNICA DA FORMA RECOMBINANTE DA
PROTEÍNA 21 DE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao
Colegiado do Programa de Pós-
graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre.

Samuel Cota Teixeira
Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva
Dra. Daiana Silva Lopes

Uberlândia
Julho – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

T266a Teixeira, Samuel Cota, 1993
2016 Atividade antiangiogênica da proteína recombinante 21 de
Trypanosoma cruzi / Samuel Cota Teixeira. - 2016.
65 p. : il.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.

Coorientadora: Daiana Silva Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Chagas,
Doença de - Teses. I. Silva, Claudio Vieira da, 1972. II. Lopes, Daiana
Silva. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.



Samuel Cota Teixeira

“Atividade antiangiogênica da forma recombinante da proteína 21 de *Trypanosoma cruzi*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 19 de julho de 2016.

Sel M.B. Jeronimo
Profa. Dra. Selma M. B. Jeronimo – UFRN

Eloisa Amália Vieira Ferro
Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro – ICBIM/UFU

Cláudio V. da Silveira
Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva (orientador) – ICBIM/UFU

*Dedico este trabalho aos meus pais, Vani e Maurício,
por me ensinarem a fé, viverem a esperança e
me sustentarem em amor.*

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu bom, perfeito e maravilhoso Deus que esteve presente comigo dia após dia, concedendo-me paz, calma e direcionamento em todas as situações. Fez-me forte, quando estive fraco. Fez-me perseverar e continuar, quando pensei em desistir. Muito obrigado Senhor Jesus! Palavras não podem expressar toda a minha gratidão por tudo o que fez e tens feito em minha vida.

À minha família (pai, mãe e irmão) que sempre me apoiaram em todos os sentidos, principalmente, financeiramente e psicologicamente para lidar com os desafios, adversidades e dificuldades.

À toda a equipe do Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), pelo aprendizado e companheirismo. São tantos que nem me arrisco a citá-los, pois correria o risco de me esquecer de alguém. Todos vocês tiveram uma contribuição ímpar em minha formação acadêmica.

Ao meu professor e orientador, Claudio Vieira da Silva, por ter me recebido de braços abertos e pelas inúmeras possibilidades e oportunidades a mim oferecidas.

Ao Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LabTox) sob responsabilidade da Professora Dra. Veridiana Melo Rodrigues Ávila, que tanto me acolheram bem no período da realização de alguns experimentos deste trabalho. Em especial, gostaria de agradecer a pós-doutoranda Daiana Silva Lopes por todos os ensinamentos, e pela ampla disposição em me ajudar.

Por fim, aos técnicos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para que esse trabalho fosse realizado.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-D – Bidimensional

3-D – Tridimensional

B.E. - Extrato bacteriano

bFGF - Fator de crescimento de fibroblasto básico

BV - *Brilliant violet*

CCC - Cardiomiosite chagásica crônica

CD - *Cluster of differentiation*

cDNA - DNA complementar

Ct - Ciclo limiar

CXCL12/SDF-1 - Fator-1 derivado de célula estromal

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECs - Células endoteliais

EMC - Matriz extracelular

HE - Hematoxilina e eosina

ICAM - *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IFN-γ - Interferon gama

IL - Interleucina

IPTG - *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

kDa - kilo dalton

LB - Luria Bertani

MIG - *Monokine induced by gamma interferon*

MPO - Mieloperoxidase

MTT - *3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio*

NAG - N-acetilglicosamina

OD - Densidade ótica

PBS - *Phosphate buffered saline*

PGN - Gelatina diluída em PBS

PI - Iodeto de propídio

PPD - *Phenylenediamine*

RNA - Ácido ribonucleico

rP21 - Proteína recombinante 21 de *T. cruzi*

RPM - Rotações por minuto

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TCT - Tripomastigota de cultura de tecido

tEnd - Célula endotelial murina derivada de hemangioma de timo

TRITC - *Tetramethyl rhodamine isothiocyanate*

VCAM - *Vascular cell adhesion molecule*

LISTA DE ABREVIATURAS - GENES

AFAP1 - *Actin filament-associated protein 110 kilodaltons (kDa)*

AFAP1L1 - *Actin filament-associated protein 1-like 1*

B2M - Beta-2 microglobulina

MMP9 - *Matrix metalloproteinase 9*

sFlt-1 - *Soluble fms-like tyrosine kinase 1*

VEGFA - *Vascular endothelial growth factor A*

VEGFR1/Flt-1 - *Vascular endothelial growth factor receptor-1/fms-like tyrosine kinase*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pares de <i>primers</i> murinos	28
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A rP21 inibe a angiogênese <i>in vitro</i>	31
Figura 2. A rP21 inibe a angiogênese <i>in vivo</i>	32
Figura 3. Manutenção do efeito inibitório da angiogênese desencadeado pela rP21 <i>in vitro</i>	34
Figura 4. Avaliação da interação da rP21 com componentes da matriz extracelular durante a formação de vasos.....	35
Figura 5. Interação da rP21 com ECs	36
Figura 6. A atividade antiangiogênica da rP21 depende da sua interação com o receptor CXCR4	38
Figura 7. A rP21 interfere na proliferação e ciclo celular de ECs.....	40
Figura 8. A rP21 promove aumento da polimerização do citoesqueleto de actina em ECs	42
Figura 9. Perfil de expressão gênica de proteínas associadas ao citoesqueleto de actina de ECs incubadas com rP21 e cultivadas em sistema de cultura celular 2-D	44
Figura 10. Perfil de expressão gênica de proteínas associadas ao citoesqueleto de actina de ECs incubadas com rP21 e cultivadas em sistema de cultura celular 3-D	45
Figura 11. A rP21 modula a expressão gênica de proteínas associadas a angiogênese	47

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS - GENES.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
Resumo	11
Abstract	12
1. Introdução	13
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	13
1.2 Aspectos gerais da Cardiomiopatia chagásica crônica (CCC).....	15
1.3 Proteína 21 de <i>T. cruzi</i>	16
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Material e métodos	18
3.1 Local de estudo	18
3.2 Animais e ética.....	19
3.3 Cultura celular.....	19
3.4 Purificação da rP21	19
3.5 Avaliação da toxicidade da rP21 sobre células tEnd	20
3.6 Ensaio de inibição da adesão celular	21
3.7 Ensaio de formação de vasos em Matrigel	21
3.8 Modelo de implante de esponjas de poliéster	22
3.9 Dosagem do conteúdo de hemoglobina de intra-implantes	22
3.10 Análise histológica.....	23
3.11 Degradação de componentes da matriz extracelular.....	23
3.12 Ensaio de ligação e internalização da rP21	24
3.13 Expressão do receptor CXCR4 em células endoteliais.....	24
3.14 Ensaio de proliferação celular.....	24
3.15 Análise do ciclo celular.....	25
3.16 Ensaio de acumulação, distribuição e recuperação de F-actina	25
3.17 Expressão gênica.....	26
3.18 Normas de biossegurança	29
3.19 Análise estatística	29
4. Resultados	29
4.1 A rP21 inibe a angiogênese <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	29

4.2 A inibição da formação de vasos desencadeada pela rP21 depende de sua interação direta com ECs	33
4.3 A atividade antiangiogênica da rP21 depende da sua interação com o receptor CXCR4.....	37
4.4 A rP21 interfere na proliferação e ciclo celular de ECs.....	39
4.5 Aumento da polimerização do citoesqueleto de actina de ECs tratadas com rP21	41
4.6 A rP21 interfere na expressão gênica de proteínas associadas ao citoesqueleto de actina de ECs	43
4.7 A rP21 altera o perfil de expressão gênica de proteínas associadas diretamente à angiogênese.....	46
5. Discussão	48
5.1 A atividade antiangiogênica da rP21 depende de sua interação direta com células endoteliais	48
5.2 A interação entre rP21-CXCR4 diminui a formação de vasos e inibe a proliferação de ECs.....	49
5.3 A rP21 induz a polimerização do citoesqueleto de actina e modula a expressão de genes relacionados com a actina em ECs	50
5.4 A rP21 modula a expressão de genes diretamente associados à angiogênese	53
5.5 Mecanismo mediado pela P21 durante a patogênese da CCC	54
6. Conclusão	56
7. Referências bibliográficas.....	56

Resumo

A doença de Chagas, causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, é a causa da Cardiomiotite chagásica crônica (CCC). A prospecção de agentes terapêuticos contra a CCC é o maior desafio. Neste cenário, a proteína recombinante 21 (rP21) de *T. cruzi* se encontra envolvida na invasão da célula hospedeira e na progressão de processos inflamatórios crônicos, o que a torna um novo potencial alvo terapêutico. O presente trabalho teve como objetivo verificar e investigar o impacto da rP21 na formação de vasos sanguíneos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, a viabilidade e adesão de células tEnd tratadas com diferentes concentrações de rP21 ou extrato bacteriano foi avaliada por MTT e a inibição da angiogênese foi verificada por ensaios da formação de vasos em Matrigel e em modelo murino. Para analisar a atividade proteolítica da rP21 em componentes da matriz extracelular, fibrinogênio, Matrigel e fibronectina foram incubados com rP21 ou não. Além disso, realizamos ensaios de proliferação celular e análise do ciclo celular. Posteriormente, o acúmulo e distribuição de F-actina foi determinado por marcação com faloidina e análise no software ImageJ. Finalmente, para análise de expressão gênica, células tEnd foram incubadas com rP21 e foi feito o RT-qPCR. Nossos resultados mostram que a rP21 não alterou a viabilidade celular e adesão, entretanto promoveu a inibição da formação de vasos *in vivo* e *in vitro*. Além disso, os ensaios de formação de vasos demonstraram que a inibição da angiogênese *in vitro* foi dependente da interação CXCR4-rP21. Somado à estes resultados, observamos que a rP21 foi capaz de inibir a proliferação celular e promover uma redução significativa no número de células 4n (fase G2/M). Além disso, observamos que a rP21 promoveu um aumento nos níveis de F-actina e modulação da expressão de genes relacionados a angiogênese e ao citoesqueleto de actina. Entretanto, a rP21 não demonstrou atividade significativa sobre os componentes da matriz extracelular. Neste sentido, concluímos que a ligação da rP21 à células endoteliais (ECs) via receptor CXCR4 promova a inibição da formação de vasos através de uma cascata de eventos intracelulares, tais como a inibição da proliferação de ECs e modulação da expressão de moléculas relacionadas a processos angiogênicos e ao citoesqueleto de actina.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*; Cardiomiotite chagásica crônica (CCC); angiogênese; rP21; células endoteliais; receptor CXCR4.

Abstract

Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is the cause of Chronic chagasic cardiomyopathy (CCC). The prospection of innovative therapeutic agents against CCC is a major task. The recombinant form of 21 (rP21), a secreted *T. cruzi* protein involved in host cell invasion and on progression of chronic inflammatory processes have been studied as a potential novel therapeutic target. Our present work aimed to verify and investigate the impact of rP21 in the formation of blood vessels *in vitro* and *in vivo*. First, tEnd cells were treated with different concentrations of rP21 or bacterial extract and viability and cellular adhesion were evaluated by MTT and angiogenesis inhibition by Matrigel tube formation assay and murine model. To verify the proteolytic activity of rP21 on extracellular matrix (ECM) components, fibrinogen, matrigel and fibronectin was incubated with rP21 or not. In addition, we performed proliferation assays and cell cycle analysis. Furthermore, the accumulation and distribution of F-actin was determined by Phalloidin staining using ImageJ software. Finally, tEnd cells were incubated with rP21 and the mRNA levels were analyzed by real-time PCR. Our results showed that rP21 did not alter cell viability and adhesion, but strongly inhibited vessel formation *in vitro* and *in vivo*. Tube formation assay showed that angiogenesis inhibition was dependent of the CXCR4-rP21 binding. In addition to these results, we observed that the rP21 was able to inhibit cell proliferation and promoted a significant reduction in the number of 4n cells (G2/M phase). Moreover, we found that rP21 significantly increased F-actin levels and this protein was able to modulate expression of genes related to angiogenesis and actin cytoskeleton. However, rP21 showed no significant activity on the matrix components. In this sense, we conclude that the rP21-endothelial cells (ECs) interaction via CXCR4 promotes inhibition of vessel formation through a cascade of intracellular events, such as inhibition of ECs proliferation and modulation of the expression of molecules associated with angiogenic processes and actin cytoskeleton.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chronic chagasic cardiomyopathy (CCC); angiogenesis; rP21; endothelial cells; CXCR4 receptor.

1. Introdução

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

Agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado de grande relevância na América Latina. Estudos realizados com tecidos de múmias do Chile e Peru demonstraram a presença da doença em humanos há 9.500 anos (AUFDERHEIDE et al., 2004).

T. cruzi pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e caracteriza-se morfologicamente por apresentar três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O desenvolvimento de um estágio a outro é um processo complexo, envolvendo mudanças ultraestruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984; WALKER et al., 2013).

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é considerada uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas, sendo endêmica na América Central e América do Sul. Estima-se que 25 milhões de pessoas estejam em zonas de risco para a doença de Chagas, a qual atinge cerca de 18 milhões de pessoas com 25.000 óbitos anuais e também afeta um número indeterminado de pessoas em regiões não endêmicas (SÁNCHEZ; RAMÍREZ, 2012; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Ao analisar a necropsia de uma criança que havia falecido durante a fase aguda da doença de Chagas, Gaspar Vianna (1911) realizou a descrição do ciclo de *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado. *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, envolvendo um hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem) e um invertebrado (vetor), representado por insetos hemípteros hematófagos da subfamília Triatominae, cujos gêneros de maior importância são *Triatoma* spp., *Rhodnius* spp. e *Panstrongylus* spp. (BARRETO, 1979; CORTEZ; MONTEIRO; NOIREAU, 2010).

A doença de Chagas apresenta várias formas de transmissão, sendo a mais conhecida por meio da urina e fezes de insetos triatomíneos infectados por *T. cruzi* (SÁNCHEZ; RAMÍREZ, 2012). Além da via vetorial clássica, a transmissão pode se dar por transfusões sanguíneas, transmissão congênita, acidentes laboratoriais, transplante de órgãos e pela via oral (DIAS; NETO; LUNA, 2011; SÁNCHEZ; RAMÍREZ, 2012).

A transmissão vetorial se inicia quando o triatomíneo - inseto vetor - ingere as formas tripomastigotas de *T. cruzi* durante o repasto sanguíneo em algum hospedeiro

mamífero infectado. No intestino médio do invertebrado, o protozoário flagelado se diferencia na forma epimastigota e replica. Posteriormente, ocorre o deslocamento deste para o intestino posterior onde, devido ao estresse nutricional nesta porção do intestino, há diferenciação em tripomastigota metacíclico (forma infectiva). Durante um novo repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas na urina e fezes do inseto penetram em um novo hospedeiro pela pele ou mucosas ulceradas (TEIXEIRA et al., 2011).

Na corrente sanguínea de mamíferos, tripomastigotas metacíclicos invadem células de vários tecidos e se transformam em amastigotas. Estas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos que serão liberados após o rompimento da célula hospedeira para a corrente sanguínea podendo invadir outras células ou serem ingeridos novamente pelo inseto vetor, fechando assim o ciclo (DE SOUZA, 2000; MORTARA et al., 2008; RASSI; RASSI Jr., 2008; HERNÁNDEZ-OSORIO et al., 2010).

Alguns trabalhos apontam a existência de um subciclo alternativo, no qual formas amastigotas de *T. cruzi* oriundas da lise precoce de células infectadas, chamadas amastigotas extracelulares são capazes de infectar outras células (DE CARVALHO; DE SOUZA, 1986; HUDSON; SNARY; MORGAN, 1984; BEHBEHANI, 1973; ALVES; MORTARA, 2009).

A patogênese da doença de Chagas pode estar relacionada à diversos fatores do parasito, hospedeiro e ambiente. Em relação ao parasito, sabe-se da existência de uma ampla diversidade genética intraespecífica de *T. cruzi*, evidenciada pelas diferenças biológicas, bioquímicas e moleculares de isolados do parasito (ANDRADE et al., 2002; DUTRA; GOLLOB, 2008; FREITAS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010).

Dessa forma, devido à variabilidade genética e biológica de *T. cruzi* e a partir de estudos de polimorfismo genético, esta espécie foi agrupada em duas grandes linhagens filogenéticas: *T. cruzi* I, associado com o ciclo silvestre e *T. cruzi* II, ligado à doença humana. No entanto, recentemente, após um consenso em relação à classificação das cepas, foi definido a divisão da espécie em seis subgrupos (*T. cruzi* I-VI). Estas cepas apresentam mecanismos diferentes de interação com a célula hospedeira e, consequentemente, diferentes mecanismos de infecção (MORTARA et al., 2005; ALVES; MORTARA, 2009).

A infecção por *T. cruzi* apresenta uma sintomatologia variada. A fase aguda, que surge logo após a infecção, caracteriza-se por apresentar uma parasitemia patente que pode perdurar por 40 a 60 dias e que acarreta uma mortalidade de aproximadamente 10% dos casos. Os sintomas podem ser moderados e atípicos, podendo ser confundidos com os de diversas outras infecções, e consequentemente a infecção não é comumente diagnosticada neste estágio (WHO, 2015). O tratamento da doença de Chagas na fase aguda consiste na utilização de benzonidazol que, apesar de relativamente eficaz, apresenta atividade mutagênica e pode produzir reações adversas e efeitos tóxicos. Por essa razão, alguns pacientes abandonam o tratamento antes do período estipulado. Além disso, cepas de *T. cruzi* resistentes a este composto têm sido descritas (MURTA et al., 1998; VILLARREAL et al., 2009).

A fase crônica, diferente da fase aguda, apresenta reduzida parasitemia. Nesta fase são acometidos alguns órgãos, como o esôfago, coração, o cólon e o sistema nervoso periférico (gânglios e nervos). Após um período assintomático que pode levar vários anos, de acordo com cada indivíduo, tornam-se evidente o comprometimento destes órgãos. Alguns sintomas são característicos, tais como complicações cardíacas que podem levar à morte súbita, megaesôfago, megacôlon e lesões no sistema nervoso periférico (WHO, 2015). É importante ressaltar que, não há tratamentos utilizados durante a fase crônica da doença que visam a eliminação do parasita. Entretanto, são utilizados apenas medicamentos que combatem os sintomas resultantes da infecção (BILATE; CUNHA-NETO, 2008; RASSI; RASSI Jr., 2008).

1.2 Aspectos gerais da Cardiomiotia chagásica crônica (CCC)

A cardiomiotia chagásica crônica (CCC) é sem dúvida uma das formas mais importantes da doença de Chagas. Estima-se que 10-30% dos pacientes cronicamente infectados desenvolvem esta manifestação clínica (HENAO-MARTINEZ; SCHWARTZ; YANG, 2012). A CCC é caracterizada por alta morbidade e mortalidade precoce na faixa etária mais produtiva, o que resulta em uma extensa carga econômica e social em áreas endêmicas (FRANCO-PAREDES et al., 2007; CASTILLO-RIQUELME et al., 2008; ABUHAB et al., 2013).

A forma mais comum e grave da CCC pode ser relacionada com anomalias ventriculares, tais como insuficiência cardíaca, arritmias, bloqueios cardíacos, eventos

tromboembólicos e morte súbita. Estima-se que 20.000 mortes ocorrem anualmente em áreas endêmicas devido a complicações da CCC. Neste contexto, a insuficiência cardíaca refratária e tromboembolismo são as principais causas de morte em pacientes cardiomopáticos (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Estas manifestações clínicas têm contribuído para tornar a doença de Chagas uma das mais importantes causas de doenças cardíacas (CARVALHO et al., 2009; GUEDES et al., 2011).

O mecanismo exato da patogênese da CCC é complexo e ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, vários estudos têm mostrado que a etiologia da CCC é provavelmente o resultado da somatória de um número de fatores que envolvem a cepa do parasito, danos do miocárdio dependente do parasito (BENVENUTI et al., 2008), parasitemia persistente (COSSIO et al., 1976; DUTRA et al., 1994; HIGUCHI et al., 1997), lesão do miocárdio imunomediada (autoimunidade) (MARIN-NETO et al., 2007) e fatores genéticos relacionados ao hospedeiro (PRATA, 2001).

A CCC é marcada por um processo inflamatório clinicamente caracterizado por uma intensa miocardite (ANDRADE et al., 1997). Modelos murinos de miocardite crônica revelaram uma modulação positiva da expressão de genes que codificam moléculas diretamente relacionadas com a resposta inflamatória, tais como quimiocinas, moléculas de adesão, catepsinas e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (HENAO-MARTINEZ; SCHWARTZ; YANG, 2012). Além disso, o infiltrado inflamatório característico da miocardite crônica durante a CCC é marcado principalmente por células T, as quais geram um microambiente enriquecido de IFN- γ o que resulta no estabelecimento e intensificação da miocardite por induzir a expressão de quimiocinas, como RANTES, IP10 (proteína 10 induzida por IFN- γ), MIG (monocina induzida por IFN- γ), ICAM (molécula de adesão intercelular) e VCAM (molécula de adesão celular vascular) (SOARES et al., 2010).

1.3 Proteína 21 de *T. cruzi*

Estudos realizados por Silva et al. (2009) identificaram, caracterizaram e sequenciaram uma proteína de 21 kDa (P21) expressa e secretada por amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* envolvida na invasão de células fagocíticas e não fagocíticas. A forma recombinante desta proteína (rP21) caracteriza-se por aderir à superfície das células alvo de forma dose-dependente. Também foi

observado que a rP21 aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos por meio da ligação desta ao receptor 4 CXC (CXCR4; CD184), o que promove a polimerização do citoesqueleto de actina da célula infectada (RODRIGUES et al., 2012).

Estudos realizados por Martins (2013) demonstraram que o tratamento de mioblastos com a rP21 resulta em uma diminuição significativa da multiplicação intracelular de *T. cruzi*, em conjunto com o aumento da polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira. Somado a isto, Araújo (2014) demonstrou que o tratamento de macrófagos e mioblastos com shRNA para proteínas relacionadas ao citoesqueleto de actina, como AFAP1L1, ARP2 e WASP ocasiona um aumento na multiplicação intracelular parasitária.

Para caracterizar novas atividades biológicas da rP21, Machado (2014) realizou experimentos empregando um modelo de inflamação crônica baseado no implante de esponjas de poliéster no dorso de camundongos, de acordo com metodologia proposta por Bailey et al. (1988) e Grindlay e Waugh (1951). Neste trabalho, camundongos com esponjas implantadas receberam, a cada 72h durante nove dias, um tratamento com doses crescentes de rP21 (10 μ g, 40 μ g e 100 μ g). Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e as esponjas foram removidas cirurgicamente e submetidas a análises bioquímicas e histológicas. Quanto as análises bioquímicas, foi observado que os implantes de esponja de poliéster tratadas com rP21 mostraram altos níveis N-acetilglicosaminidase (NAG), indicando que a rP21 participa da ativação de macrófagos. Altas doses de rP21 promoveram um aumento significativo na produção de mieloperoxidase (MPO), enzima expressa por neutrófilos ativados, o que evidencia a habilidade desta proteína em recrutar células imunes, como macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Além disso, a análise de cortes histológicos das esponjas de poliéster, demonstrou que a rP21 participa de processos relacionados ao recrutamento de mastócitos. Ainda neste estudo, verificou-se uma redução significativa no conteúdo de hemoglobina, sugerindo um potencial antiangiogênico da rP21.

A partir de estudos prévios, é possível verificar que a proteína recombinante 21 de *T. cruzi* apresenta importantes atividades biológicas, tais como indução da polimerização do citoesqueleto de actina, recrutamento de células do sistema imunológico, potencial antiangiogênico e outros princípios. Nesse sentido, o presente trabalho propôs explorar a atividade antiangiogênica da rP21, bem como o potencial da proteína nativa no desenvolvimento e progresso da CCC.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Verificar o impacto da rP21 na formação de vasos sanguíneos utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* de estudo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade da rP21 sobre células endoteliais (ECs);
- Investigar o potencial de inibição da adesão de ECs causado pela rP21;
- Verificar a atividade antiangiogênica da rP21 *in vitro* e *in vivo*;
- Analisar a interação da rP21 com os componentes da matriz extracelular;
- Investigar a participação do receptor CXCR4 durante a inibição da formação de vasos mediada pela rP21;
- Verificar o impacto da rP21 na proliferação e ciclo celular de ECs;
- Analisar a influência da rP21 no citoesqueleto de actina de ECs;
- Analisar o impacto da rP21 no perfil de expressão gênica de proteínas associadas ao citoesqueleto de actina e angiogênese em ECs cultivadas em sistema de cultura celular bidimensional (2-D) e tridimensional (3-D).

3. Material e métodos

3.1 Local de estudo

Os ensaios deste estudo foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI) e Laboratório de Osteoimunologia e Imunologia dos Tumores, ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia. Experimentos também foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LabiTox), pertencente ao Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da UFU. Além destes, também contamos com a colaboração do Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária/Hanseníase (FAMED/UFU) e Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.2 Animais e ética

Camundongos C57BL/6 machos com seis a oito semanas de idade foram mantidos sob condições padrão de 12 h de luz e 12 h de escuro, em temperatura de $25\pm2^{\circ}\text{C}$, com ração e água *ad libitum*. A manutenção, manipulação e eutanásia dos animais respeitaram as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Este estudo faz parte do projeto intitulado: “Estudos de moléculas envolvidas na invasão e tráfego intracelular das formas infectivas de *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo*. Emprego da P21 na indução de proteção contra a doença de Chagas.”, aprovado pelo CEUA/UFU (Número de protocolo 059/08).

3.3 Cultura celular

Células endoteliais (ECs) murinas derivadas de hemangioma de timo (tEnd) foram utilizadas conforme estabelecido por Bussolino et al. (1991) e Achê et al. (2014). As células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) acrescido com 10% de soro fetal bovino (FBS) e suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, mantidas em estufa 37°C e 5% CO₂.

3.4 Purificação da rP21

Bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21 transfetadas com o plasmídeo pET-28^a(+) (Novagem) apresentando o gene que codifica a rP21, em um pré-inóculo, foram colocadas em meio Luria-Bertani (LB) com o antibiótico de seleção Kanamicina (50 µg/mL). O pré-inóculo foi mantido sob agitação por 18h a 37°C . Em seguida, o pré-inóculo foi diluído 1:50 do mesmo meio e incubado a 37°C , com agitação a 150 RPM, até atingir a densidade óptica (OD) entorno de 0,6 a 0,9. Após, foi adicionado 1mM de *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG), objetivando estimular a expressão da proteína recombinante. Após 3h de incubação, a solução foi centrifugada 10000 RPM por 20 min, e o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensido em solução de ureia 6M.

Para promover a lise bacteriana foi acrescentado, ao material ressuspensionado, 10 μ L de lisozima a cada 10 mL de solução por 20 min. Em seguida, foi utilizado o Sonicador Branson Sonifier 450, o qual promoveu a sonicação do extrato bacteriano, durante 20 ciclos de um minuto com 30 segundos de intervalo entre os ciclos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 20200 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em solução tampão de ureia 6M.

A amostra foi incubada com uma resina de níquel e deixada *overnight* sob agitação a 4°C. No dia seguinte, a resina foi submetida a: (1) três lavagens em tampão de ligação (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M); (2) três lavagens com tampão de lavagem (imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M); (3) quatro eluições com tampão de eluição (imidazol 1M, NaCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M), contendo concentrações crescentes de imidazol (5mM, 20mM e 1M, respectivamente) para competir com a cauda de histidina, presente na rP21, pela coluna de níquel e liberar a proteína recombinante purificada.

O material eluído foi dialisado em PBS 1x com uma membrana de diálise de 3,5 kDa (Spectra/Por 131198) por 48 h sob agitação contínua a 4°C para a purificação da proteína dos resíduos de ureia e promover o renovelamento proteico. A solução de PBS 1x foi reposto após o primeiro dia de diálise.

A concentração da amostra foi quantificada por espectrofotometria utilizando-se a técnica de Bradford (Bradford, 1976). Com o intuito de verificar a pureza da rP21 eluída foi realizado um gel de SDS-PAGE 13% (Laemmli, 1970) com coloração de Coomassie Blue.

A rP21 (GenBank: EU004210.1) foi purificada de acordo com protocolos previamente descritos por Silva et al. (2009) e Dos Santos et al. (2014). O extrato bacteriano (B.E.), utilizado como controle experimental, foi produzido sob as mesmas condições que a rP21, com exceção da indução da expressão da rP21.

3.5 Avaliação da toxicidade da rP21 sobre células tEnd

A viabilidade de células tEnd tratadas com rP21 foi avaliada pelo método de MTT (*3-(4,5-dimetitiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazólio*). As células foram plaqueadas ($1,5 \times 10^4$ células/poço) em placa de 96 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de rP21, B.E. ou meio de cultura (grupo controle) por

24h, e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. No dia seguinte, as células foram incubadas com 5 mg/mL de MTT por 3 h a 37°C. Cristais de formazano resultantes da redução de MTT foram dissolvidos com a adição de 100 µL de PBS contendo 10% de SDS e 0,01 M HCl (18 h, 37°C e 5% CO₂). A absorbância (570 nm) foi lida em um espectrofotômetro scanner multipoços (Thermo Scientific).

3.6 Ensaio de inibição da adesão celular

Células tEnd (2×10^4 células/poço) foram pré-incubadas com concentrações crescentes de rP21, B.E. ou com meio de cultura (grupo controle) por 30 minutos e mantidas em estufa (37°C e 5% CO₂). Em seguida, foram plaqueadas em placa de 96 poços e deixadas por 2 h em estufa, para promover adesão das células. Após, as células que não aderiram à placa foram removidas através de duas lavagens sucessivas com PBS 1x. Finalmente, as células foram incubadas com 5 mg/mL de MTT por 3 h a 37°C, como descrito acima.

3.7 Ensaio de formação de vasos em Matrikel

A influência da rP21 na formação de vasos *in vitro* foi avaliada conforme previamente descrito por Hu et al. (1995) e Achê et al. (2014), com modificações. Para verificar o impacto da rP21 na formação de vasos, células tEnd (5×10^5 células/poço) foram pré-incubadas com concentrações crescentes de rP21 (20, 40 e 80 µg/mL), extrato bacteriano (20, 40 e 80 µg/mL) ou com meio de cultura (grupo controle) por 30 minutos à temperatura ambiente.

Em um primeiro ensaio, para avaliar se a atividade antiangiogênica da rP21 ocorre por uma interação direta com as ECs, células tEnd pré-incubadas com rP21 (40 µg/mL) foram lavadas com PBS 1x estéril e centrifugadas (5 min, 1500 RPM).

Em outro momento, com o intuito de verificar se a inibição da formação de vasos mediada pela rP21 depende da sua ligação ao CXCR4, células tEnd foram tratadas com um antagonista específico do receptor, AMD3100 (iCXCR4 – inibidor de CXCR4) (30 µM) com subsequente tratamento com ou sem rP21.

Em todos os ensaios supracitados, após o tratamento, as células foram semeadas em placa de 24 poços previamente revestidas com 50 µL de Matrikel (5,25 mg/mL) (BD Bioscience) e incubadas com meio suplementado de fator de crescimento de fibroblasto

básico (bFGF) (30 ng/mL). Após 18h de incubação à 37°C e 5% CO₂, as células foram submetidas à um microscópio invertido e fotografadas em um aumento de 20x. Imagens foram adquiridas no aumento de 20x utilizando-se microscópio de luz acoplado à câmera fotográfica. Além disso, o número de vasos formados foram contados. No ensaio de manutenção do potencial antiangiogênico da rP21, as imagens e quantificação dos vasos foram realizados com 24, 48 e 72 h de incubação nas mesmas condições de temperatura e umidade.

3.8 Modelo de implante de esponjas de poliéster

Esponjas de poliéster com 1,2 cm de diâmetro (Vitafoam Ltd.) foram armazenadas em etanol 70% v/v por 24 h e, subsequentemente, aquecidas em água destilada durante 30 minutos (ANDRADE, FAN; LEWIS, 1987; PLUNKETT; HAILEY, 1990). Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos de 6 animais para dosagem de hemoglobina e 6 animais para análise histológica, tratados com PBS, 40 µg/mL de rP21 (SILVA et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2014), ou B.E. (40 µg/mL). Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com cetamina-xilazina (Syntec) (60mg-4mg/kg) e submetidos a tricotomia e antisepsia na região dorsal com álcool 70%. As esponjas foram introduzidas por incisão mediana na região interescapular. As incisões foram fechadas com uma sutura Donati usando nylon 3.0. Após a recuperação da anestesia, os animais foram colocados em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum*. Os tratamentos foram injetados nas esponjas de cada animal a cada 72 h durante 9 dias.

3.9 Dosagem do conteúdo de hemoglobina de intra-implantes

A determinação do teor de hemoglobina intra-implante foi realizada usando reagentes de Drabkin (ANDRADE, FAN; LEWIS, 1987; PLUNKETT; HAILEY, 1990). Os implantes foram removidos e as massas foram determinadas com auxílio de balança de alta precisão. As amostras que apresentaram hemorragia macroscópica ou infecção foram excluídas da análise. Cada implante foi homogeneizada (Tekmar TR-10, Ohio, EUA) em 2 mL de um reagente cromogênio específico para hemoglobina (Kit de Drabkin, Labtest) e adicionados a tubos de 2 mL. As amostras foram centrifugadas a 4°C durante 30 minutos a 12.000 x g e os homogeneizados foram filtrados através de

filtros de 0,22 µm (Millipore). A análise espectrofotométrica foi realizada a 540 nm, utilizando placas de 96 poços. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada com base numa curva padrão e os resultados foram expressos como a concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso molhado do implante.

3.10 Análise histológica

Esponjas designadas para análise histológica foram fixadas em tampão Metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio, 10% de ácido acético) durante 3 h a 4°C. As esponjas foram preparadas para inclusão em álcool etílico PA durante 30 minutos com 4 lavagens em xileno, seguido de mais 30 minutos de incubação, três lavagens e, finalmente, embebidas em parafina. Os blocos foram processados para coloração de hematoxilina e eosina (HE). As imagens foram obtidas em um microscópio DM500 Leica acoplado a câmera e *software Las Ez*. A partir das imagens obtidas, foram contados o número de vasos sanguíneos em 40 campos aleatórios de cada corte histológico.

3.11 Degradação de componentes da matriz extracelular

A degradação de componentes da ECM foi analisada conforme descrito (DE OLIVEIRA et al., 2009; KUMAR et al., 2010; ESCALANTE et al., 2011). Para avaliar a possível atividade fibrinogenolítica da rP21, 50 µL de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL em PBS, pH 7,8) foi incubado com diferentes quantidades de rP21 (5, 10, 20 e 40 µg) por 1 h a 37°C. A reação foi finalizada por meio da adição de 25 µL de solução de parada (0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, contendo 10% (v/v) glicerol, 10% (v/v) β-mercaptoetanol, 2% (w/v) SDS e 0,05% (w/v) azul de bromofenol). Por fim, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e analisadas por gel de SDS-PAGE 12,5% (w/v).

Matrigel (1 mg/mL) e fibronectina (1 mg/mL em 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) foram incubados com 40 µg de rP21 a 37°C por 1 h. A reação foi finalizada pela adição de solução de parada. As amostras foram aquecidas e a digestão dos substratos foi analisada por gel SDS-PAGE 7% (w/v), conforme mencionado acima.

3.12 Ensaio de ligação e internalização da rP21

A direta interação da rP21 com ECs foi assegurada conforme previamente descrito (LÓPEZ et al., 2010; BÄUMER et al., 2016). Células tEnd foram plaqueadas em uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células/lamínula em placa de 24 poços. Após a adesão, foram incubadas com rP21 por 24 h. Após, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com formaldeído 4% por 1 h em temperatura ambiente. Após lavar três vezes com PBS 1x, as células foram incubadas *overnight* com anticorpo policlonal primário anti-rP21 (diluído 1:200 em solução de PGN com 0,01% de saponina). Em seguida, as lamínulas foram lavadas e incubadas com IgG anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (1:200 em PGN+saponina), faloidina conjugada com *tetramethyl rhodamine isothiocyanate* (TRITC) (1:500 em PGN+saponina) e *4,6-diamidino-2-phenylindole dilactate* (DAPI, Invitrogen, USA) (1:500 em PGN+saponina) por 1 h. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro previamente cobertas com *phenylenediamine* (PPD) e analisadas por microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha) utilizando um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 200 M).

3.13 Expressão do receptor CXCR4 em células endoteliais

Para verificar a expressão do receptor CXCR4, células tEnd (1×10^6 células) foram fixadas com formaldeído 4% por 1 h, lavadas com PBS e, em seguida, marcadas com anticorpo anti-CXCR4 HU CD184 BV 421 12G5 50 TT diluídos em PBS. As amostras foram analisadas em um *FACSCantoII* (BD), e os resultados foram obtidos utilizando *software FlowJo* (versão 7.6.3).

3.14 Ensaio de proliferação celular

A proliferação de células tEnd tratadas com rP21 foi avaliada utilizando o método de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) (LÓPEZ et al., 2010). Resumidamente, as células foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço em placa de 96 poços. Após a adesão, as células foram cultivadas em meio suplementado com FBS e bFGF na presença ou ausência de 40 µg/mL de rP21 por 24, 48 e 72 h a 37°C e 5% CO₂. Como controle negativo, as células foram cultivadas em meio livre de bFGF e FBS. Após o período de tratamento, as células

foram incubadas com 5 mg/mL de MTT durante 3 h a 37°C. Os cristais de formazano resultantes da redução do MTT foram dissolvidos pela adição de 100 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 10% de SDS e HCl 0,01 M (18 h, 37°C e 5% CO₂). A absorbância (550 nm) foi medida em espectrofotômetro (Thermo Scientific).

3.15 Análise do ciclo celular

O ciclo celular foi analisado por quantificação do teor de DNA, como previamente descrito (CRISSMAN; STEINKAMP, 1973; KRISHAN, 1975). Resumidamente, células tEnd foram plaqueadas a uma densidade de $0,25 \times 10^5$ células/poço em placa de 24 poços e, depois da adesão, as células foram tratadas com rP21 (40 µg/mL) ou meio de cultura (grupo controle) durante 24 h a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram colhidas e fixadas em formaldeído 4% durante 1 h à temperatura ambiente. Para assegurar que apenas o DNA fosse corado, as células foram tratadas com uma solução de RNAase (100 µg/mL) durante 30 minutos a 4°C e em seguida coradas com iodeto de propídio (PI) (50 µg/mL) durante 30 minutos à temperatura ambiente. O ciclo celular foi analisado em *FACSCantoII* (BD), e os dados foram obtidos usando o *software FlowJo* (versão 7.6.3).

3.16 Ensaio de acumulação, distribuição e recuperação de F-actina

A acumulação e distribuição F-actina foram determinados como descrito (STAMATAKOU; HOYOS-FLIGHT; SALINAS, 2015). Células tEnd foram semeadas a uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células/lamínula em placa de 24 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de rP21 (20, 40, e 80 µg/mL) ou meio de cultura (grupo controle) por 1h30 a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído 4% durante 1 h à temperatura ambiente, e as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS. As células foram incubadas com faloidina-TRITC (diluída 1:500 em PGN+saponina) e DAPI (diluído 1:500 em PGN+saponina) durante 1 h para marcar a F-actina e os núcleos celulares, respectivamente.

O experimento de recuperação de F-actina foi realizado como previamente descrito (GRABHAM; REZNIK; GOLDBERG, 2003; STAMATAKOU; HOYOS-FLIGHT; SALINAS, 2015). Células tEnd foram semeadas a uma densidade de 2×10^4

células/lamínula em placa de 24 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com 1,5 μ M de citocalasina-D (um inibidor farmacológico da montagem de subunidades de actina nas extremidades de filamento farpado) durante 40 minutos para induzir a desmontagem da actina, seguido por um período de recuperação de 1h30 na presença de rP21 (40 μ g/mL) ou meio de cultura (grupo controle), durante o qual a F-actina seria remontada. Em seguida, as células foram submetidas às mesmas condições de marcação descritos acima. Em ambos experimentos, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro, e as imagens fluorescentes foram capturadas com objetiva de 63 \times em óleo de imersão utilizando um microscópio invertido de fluorescência (Zeiss Axiovert 200M). As imagens digitais foram analisadas usando software de microscopia de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha), e a média de fluorescência da F-actina foi determinada pelo software *ImageJ* (National Institutes of Health, USA) (STAMATAKOU; HOYOS-FLIGHT; SALINAS, 2015).

3.17 Expressão gênica

Para os experimentos de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), células tEnd (1×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços previamente revestidas com uma fina camada de ECM (sistema de cultura de células em 3-D) ou não (sistema de cultura de células em 2-D). As células foram então incubadas com rP21 (40 μ g/mL) ou meio de cultura (grupo controle) durante 24 e 72 h. O RNA total foi extraído utilizando o *Kit RiboZol™ Plus RNA Purification* (Amaresco), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações e a qualidade do RNA foram determinadas a 260/280 nm em espectrofotômetro *NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer* (Thermo Scientific).

Para a transcrição reversa, foi utilizado *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o cDNA foi sintetizado com 10 μ L de RNA (20 ng/mL), 2 μ L de 10X RT Buffer, 0,8 μ L de 25X de *dNTP Mix* (100 mM), 2 μ L de 10X *RT Random Primers*, 1 μ L de *MultiScribe™ Transcriptase Reversa* e 4,2 μ L de água isenta de nuclease em um volume total de 20 μ L por reação/amostra. A transcrição reversa foi realizada sob as seguintes condições de amplificação: 25°C durante 10 min,

37°C durante 120 min, 85°C durante 5 min. Finalmente, as amostras foram arrefecidas a 4°C, e os cDNAs sintetizados foram armazenadas a -20°C.

A RT-qPCR foi realizada utilizando um sistema *ABI 7300* (Applied Biosystems), e o *SDS Software v1.4.1* (Applied Biosystems) foi utilizado para analisar os dados obtidos. A reação consistiu em 5 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (2X) (Applied Biosystems), 10 µM de *primers forward e reverse* (0,5 µL F + 0,5 µL R), 4 µL de água isenta de nuclease, e 2 µL de cDNA (125 ng/µL) em um volume total de 12 µL por reação/amostra. O seguinte protocolo de ciclos térmicos foi usado, tal como recomendado pelo fabricante: 95°C durante 10 min, 95°C durante 15 segundos, e 60°C durante 1 min por 40 ciclos. Os ciclos foram seguidos por uma análise da curva de *melting* a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 min.

As sequências dos iniciadores específicos (*primers*) para os genes em estudo foram desenhadas utilizando alinhamentos de sequências obtidas a partir do *GenBank* (NIH/NCBI) com o auxílio da ferramenta *IDT PrimerQuest* (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>; San Diego, CA), com validação a partir das ferramentas *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Bethesda, USA) e *Standart Nucleotide BLAST* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, Bethesda, USA) para confirmar especificidade.

A normalização dos dados se deu pela utilização de beta-2 microglobulina (B2M) como gene endógeno/referência (*housekeeping gene*) e, em seguida, foram analisados através do método comparativo de ciclo limiar (C_T) para calcular as alterações na expressão de dobragem (*fold change*) nos grupos tratados com rP21 em comparação com o grupo controle, onde $\Delta C_T = C_T$ do gene de interesse menos C_T do B2M e $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ dos grupos tratados com rP21 menos a média do ΔC_T dos grupos tratados com meio de cultura (calibrador). As alterações na expressão gênica para os grupos tratados com rP21 foram então calculadas como $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Todos os experimentos em tempo real foram realizados em triplicadas biológicas e técnicas.

Tabela 1 - Pares de *primers* murinos

Gene		Sequência	Sequência de referência
AFAP1	FW	CCATCGTAGGCTACAAGGAC	NM_011072.4
	RV	CAACCTCAGCTGGCGTAATG	
AFAP1L1	FW	CGACTGGGACGAGACAAATAC	NM_010833.2
	RV	CCCACTACATGGACTCAAACTC	
ARP2	FW	TCTCACCCACCTCATTCCCTT	NM_007984.2
	RV	CCTAGGGCCTTCAACAGTAAC	
ARP3	FW	GAGGCGACAGCTACATCATT	NM_001206367.1
	RV	AACCTCATCCTGGTAGACT	
Cofilina	FW	CTCTCCCTGTCAACTGTGTTTC	NM_178928.4
	RV	TTTCCCATTCTTGGCCTTC	
Cortactina	FW	GTGACTCTGTGCTTGTCTGT	NM_007687.5
	RV	CTGCTTCCATGAGTGGTCAA	
Ezrina	FW	CATCGCAGATGCCCTCATATC	NM_007803.5
	RV	GCAGAGGCTTCCACATCTT	
Fascina	FW	CAGGCGCAGGATCAGATAAA	NM_009510.2
	RV	CTCTTCTACCTCGTCCTCCTT	
Gelsolina	FW	GCACTGGGTTGTGAAGTGT	NM_146243.2
	RV	CCCACTTGGTGGTTGATCTG	
MMP9	FW	CCATGTTAGGGACTTTGGA	NM_023735.2
	RV	AGGCTTGGGCTTCAATCTAC	
Moesina	FW	CCACTTGTGGCTACCTGAAT	NM_027373.2
	RV	CCTGTCCTGTGGAGAATGAG	
Profilina-1	FW	GGGAGACAATGGGATGAAAG	NM_001025250.3
	RV	GTCGTGTTCTGGAAGTGAG	
sFlt-1	FW	AGAAGACTCGGGCACCTATG	D88690.1
	RV	AGGTTTGAAAGCAGGTGTGG	
VEGFA	FW	CCATCACTCTGAACCTTGTC	NM_010228.3
	RV	CTAACGAGAACTTCTGTCTTC	
VEGFR1/Flt-1	FW	CATAGAGGAAGGCCATTACAG	NM_013599.3
	RV	ACATTGACGTCCAGAGAAG	
βeta-2 microglobulina	FW	CATAGAGGAAGGCCATTACAG	NM_009735.3
	RV	ACATTGACGTCCAGAGAAG	

FW: forward; RV: reverse

3.18 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos envolvendo manuseio de amostras biológicas e reagentes, bem como a utilização de equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2005).

3.19 Análise estatística

Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se *one-way* ANOVA, *Student's t-test*, ou *Tukey's multiple comparisons test* para os dados paramétricos ou o *Mann-Whitney test* para os dados não paramétricos, de acordo com o projeto experimental (*GraphPad Prism Software*, versão 6.01). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 A rP21 inibe a angiogênese *in vitro* e *in vivo*

Para avaliar o potencial antiangiogênico da rP21, ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados. Nos experimentos *in vitro*, verificamos a atividade da rP21 sobre a viabilidade e adesão celular e o impacto da proteína na formação de vasos em Matrigel. Para isso, células tEnd foram tratadas com diferentes concentrações de rP21, B.E. ou meio de cultura (controle) e observamos que a rP21 não alterou a viabilidade das células e a adesão destas à superfície da placa (**Figura 1A, B**), porém a formação de vasos foi fortemente inibida (**Figura 1C**). O tratamento com B.E. mostrou toxicidade celular e inibição da adesão, nas concentrações de 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 1A, B**). Imagens representativas destacando a morfologia das células e vasos são mostradas (**Figura 1D**).

Diante da potencial atividade de inibição da formação de vasos apresentada pela rP21 *in vitro*, propusemos avaliar essa atividade utilizando implantes de esponjas de poliéster em modelos murinos. Neste sentido, a determinação do conteúdo de hemoglobina revelou uma diminuição significativa nos níveis de hemoglobina em esponjas tratadas com rP21, o que não foi observado nos demais grupos (**Figura 2A**). Para confirmar essa atividade, cortes histológicos a partir das esponjas foram preparados

e corados com HE. Nossos resultados mostram que esponjas tratadas com rP21 apresentaram uma diminuição significativa do número de vasos sanguíneos em comparação com os tratamentos controle (**Figura 2B**). Imagens representativas do número de vasos sanguíneos são destacadas (**Figura 2C**).

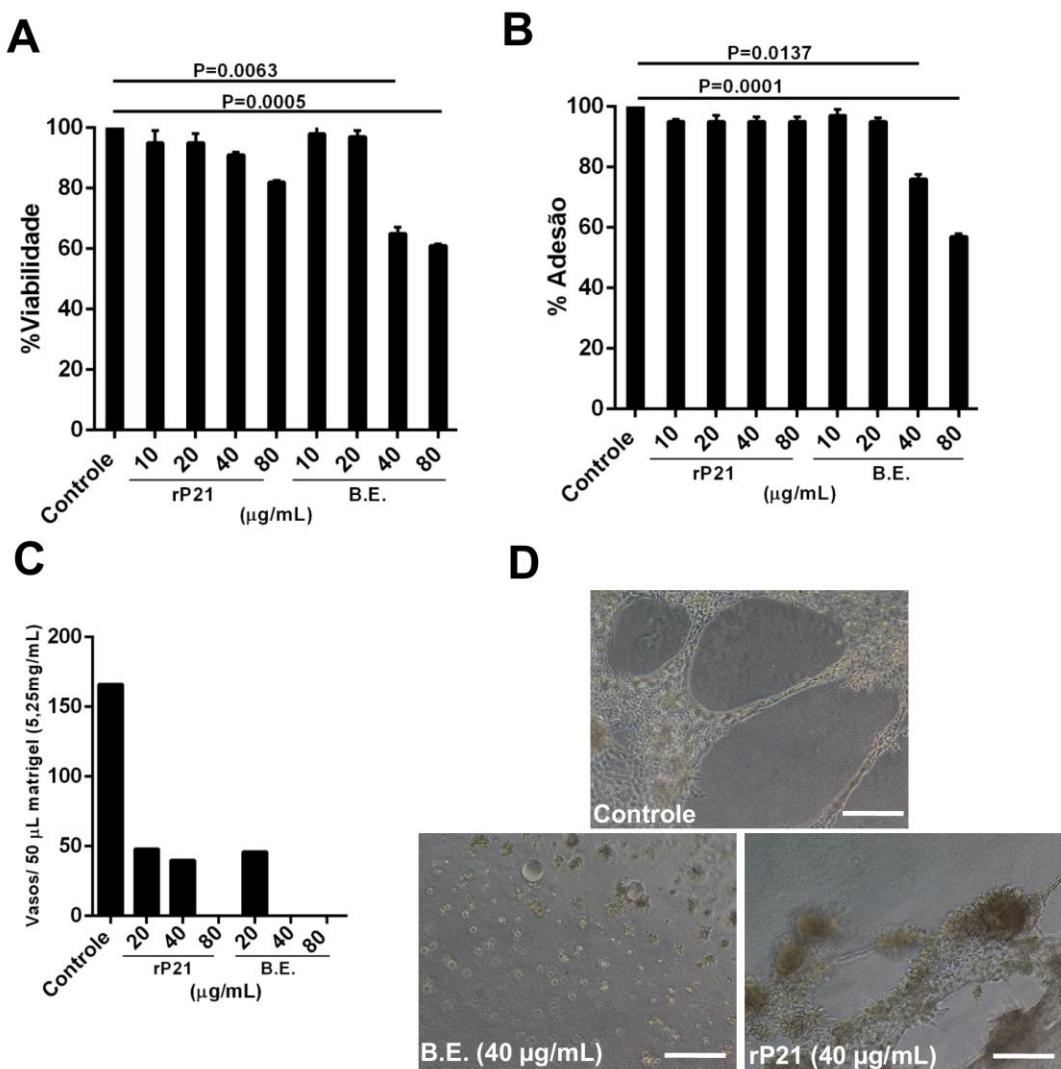


Figura 1. A rP21 inibe a angiogênese *in vitro*. (A) A rP21 não alterou a viabilidade das células tEnd. (B) Células tEnd pré-incubadas com rP21 não sofreram interferência no processo de adesão celular. Entretanto, o B.E. demonstrou toxicidade celular e inibição da adesão nas concentrações de 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$. (C) A rP21 inibiu fortemente a formação de vasos em Matrigel. (D) Imagens representativas destacando a morfologia dos vasos são mostradas. Diferenças significativas foram determinadas por *one-way* ANOVA e Tukey's multiple comparisons test (GraphPad Prism software, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. B.E.: Extrato bacteriano.

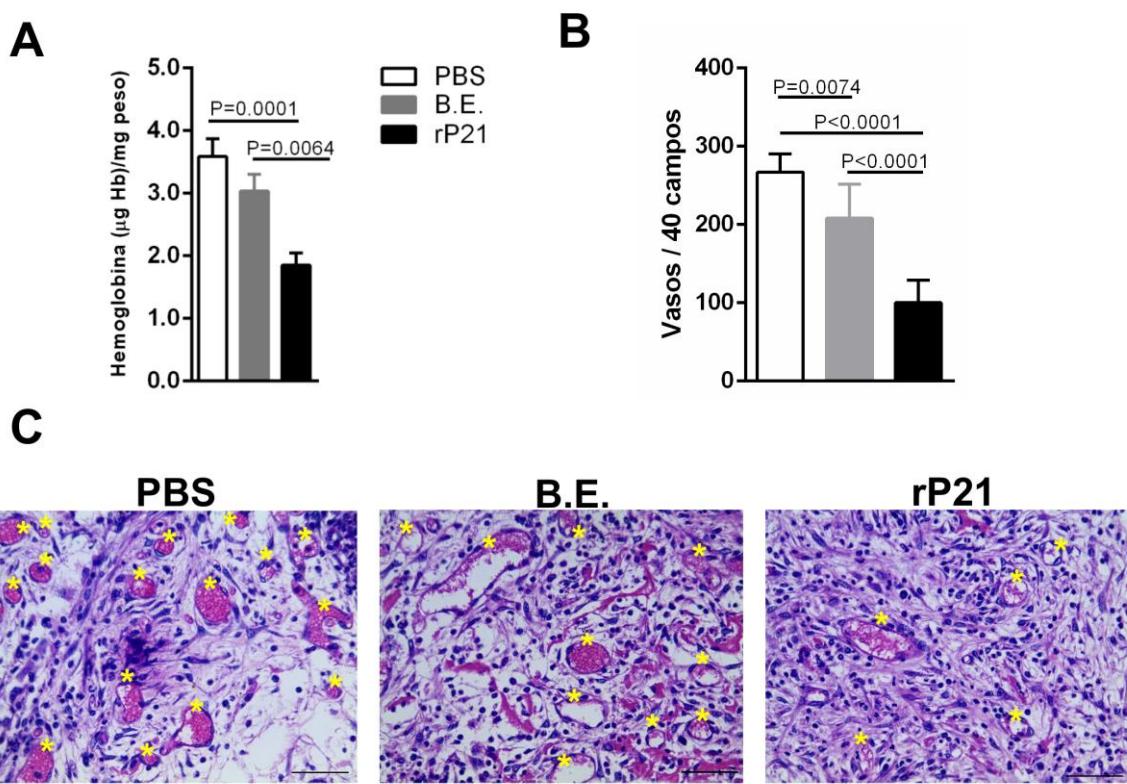


Figura 2. A rP21 inibe a angiogênese *in vivo*. Esponjas de poliéster foram introduzidas por incisão mediana na região interescapular de camundongos C57BL/6. Os animais foram submetidos a tratamentos intra-implantes com PBS, B.E. e rP21 a cada 72 h durante 9 dias. (A) Esponjas de poliéster tratadas com rP21 apresentaram uma redução significativa no conteúdo de hemoglobina e (B) no número de vasos sanguíneos comparado com os grupos controles (B.E. e PBS). (C) Imagens representativas de cortes de esponjas de poliéster e coradas com HE são demonstradas. Asteriscos em amarelo indicam a presença de vasos sanguíneos. Diferenças significativas foram determinadas por *one-way* ANOVA e *Tukey's multiple comparisons test* (GraphPad Prism software, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. PBS: Phosphate Buffered Saline. B.E.: Extrato bacteriano.

4.2 A inibição da formação de vasos desencadeada pela rP21 depende de sua interação direta com ECs

Para melhor compreendermos o papel ativo da rP21 durante o processo de manutenção da inibição da angiogênese, células tEnd foram plaqueadas em placas de 24 poços previamente revestidas com uma fina camada de matriz extracelular (Matrigel) e incubadas com rP21 (40 µg/mL) durante 24, 48 e 72 h. Observamos que a rP21 manteve sua capacidade de inibir a formação de vasos ao longo dos tempos analisados, o que foi verificado através da redução quantitativa e qualitativa no número de vasos do grupo tratado com a proteína, quando comparado com o grupo controle (não tratado) (**Figura 3**).

Com o intuito de verificar se a atividade antiangiogênica da rP21 ocorre por uma interação com componentes da matriz extracelular ou por interação direta com ECs, fibrinogênio bovino, Matrigel e fibronectina foram ou não incubados com rP21 por 1 h. Observamos que a proteína não foi capaz de promover a degradação destes componentes da ECM em comparação com os grupos controles (não tratados), independentemente da quantidade proteica utilizada (**Figura 4A, B**).

Adicionalmente, células tEnd foram incubadas com rP21, e as células foram então lavadas (centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura sem tratamento) ou não e, em seguida, plaqueadas sobre uma camada fina de ECM (Matrigel). Nossos resultados mostraram que, em ambas as situações, a rP21 foi capaz de inibir o processo de angiogênese, indicando que esta proteína interage diretamente com ECs (**Figura 4C, D**). Para verificar o processo de interação rP21-ECs, células tEnd foram plaqueadas em lamínulas circulares e tratadas com rP21 por 24 h. A análise por microscopia confocal mostrou que a rP21 consegue ligar-se às ECs e ser internalizada por estas (**Figura 5**).

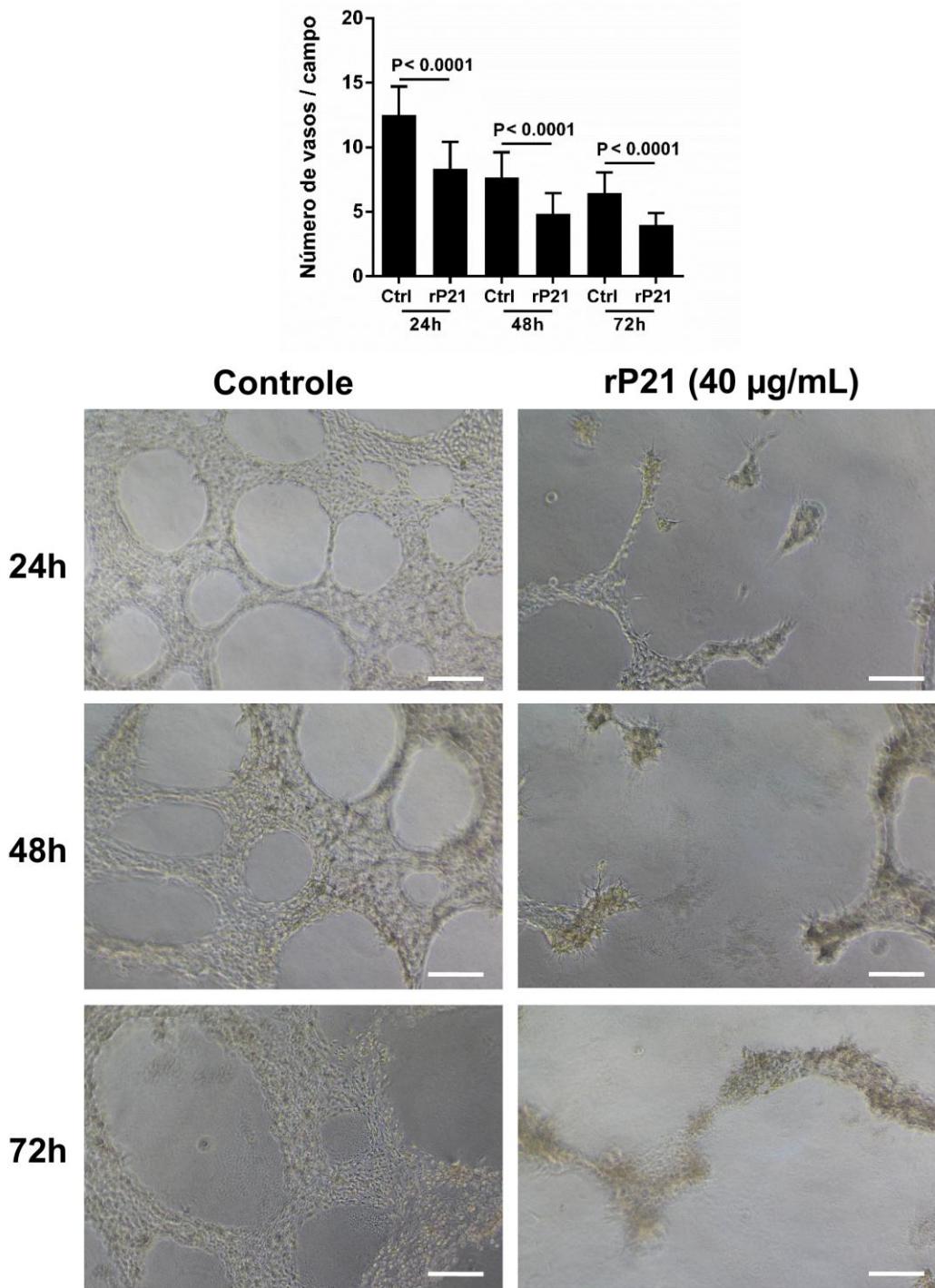


Figura 3. Manutenção do efeito inibitório da angiogênese desencadeado pela rP21 *in vitro*. No ensaio de formação de vasos em Matrigel, células tEnd foram incubadas com rP21 por 24, 48 e 72 h e o número de vasos foi quantificado. A rP21 promoveu um efeito inibitório dependente do tempo na angiogênese *in vitro*, o qual foi observado em 24, 48 e 72h. Imagens representativas da formação de vasos sobre a fina camada de matriz extracelular são demonstradas ao longo dos tempos analisados. Diferenças significativas foram determinadas por *Student's t-test* e *Mann-Whitney test* (*GraphPad Prism software*, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

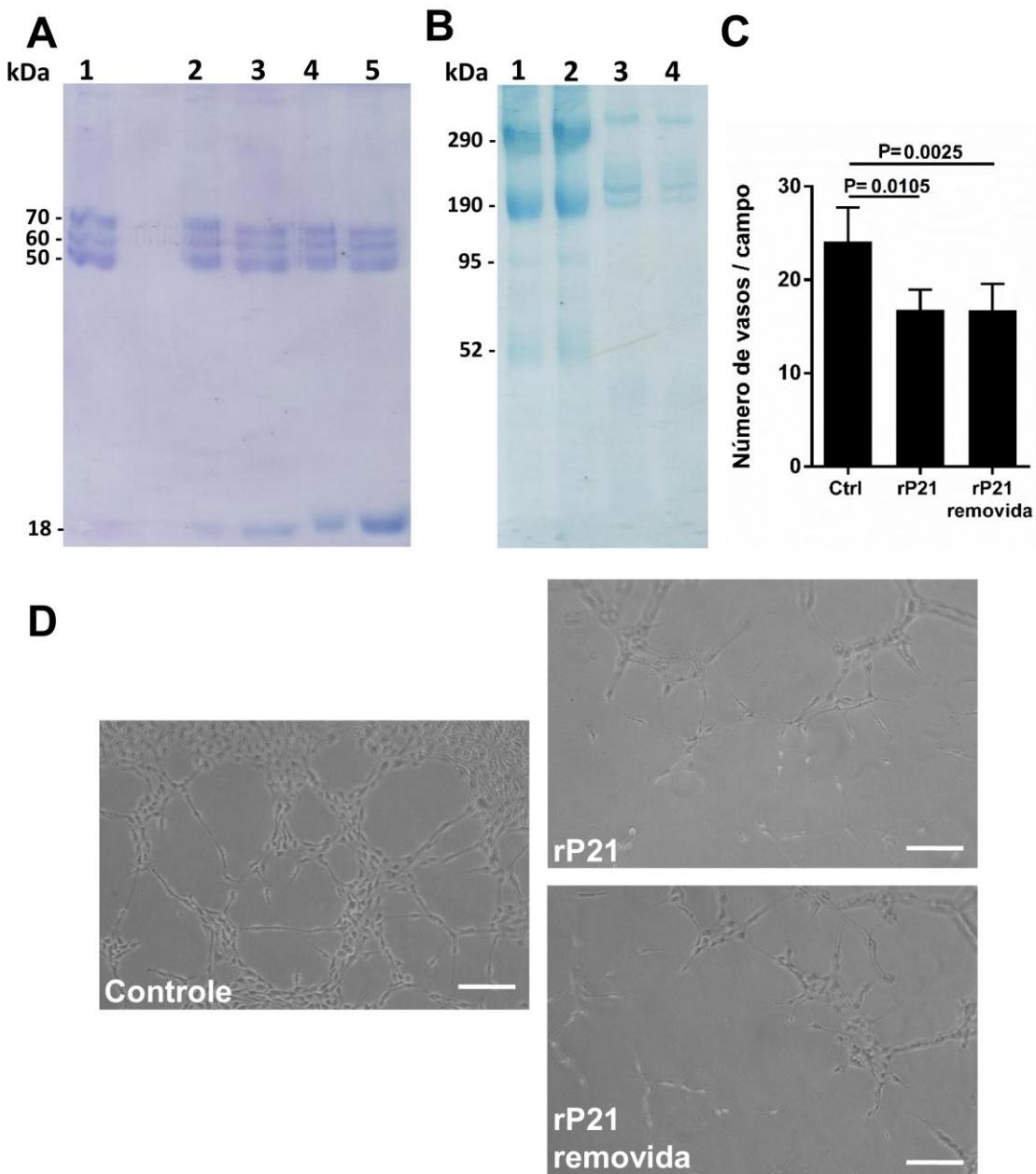


Figura 4. Avaliação da interação da rP21 com componentes da matriz extracelular durante a formação de vasos. A rP21 foi incubada com 50 µL de diferentes substratos a 37°C por 1h. (A) 1: Fibrinogênio bovino. 2-5: Fibrinogênio bovino incubado com 5, 10, 20 e 40 µg de rP21, respectivamente. (B) 1: Matrigel (sem rP21). 2: Matrigel incubado com 40 µg de rP21. 3: Fibronectina (sem rP21). 4: Fibronectina incubada com 40 µg de rP21. A rP21 não promoveu a degradação dos componentes da matriz extracelular. (C) Células tEnd pré-incubadas com rP21 foram centrifugadas, lavadas com PBS e semeadas sobre Matrigel. A remoção mecânica da rP21 pós-tratamento não interferiu em sua atividade antiangiogênica. (D) Imagens representativas mostram qualitativamente o impacto da rP21 na inibição da formação de vasos *in vitro*. Diferenças significativas foram determinadas por *one-way* ANOVA e *Tukey's multiple comparisons test* (GraphPad Prism software, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. kDa: kilo Daltons. rP21 = 18 kDa.

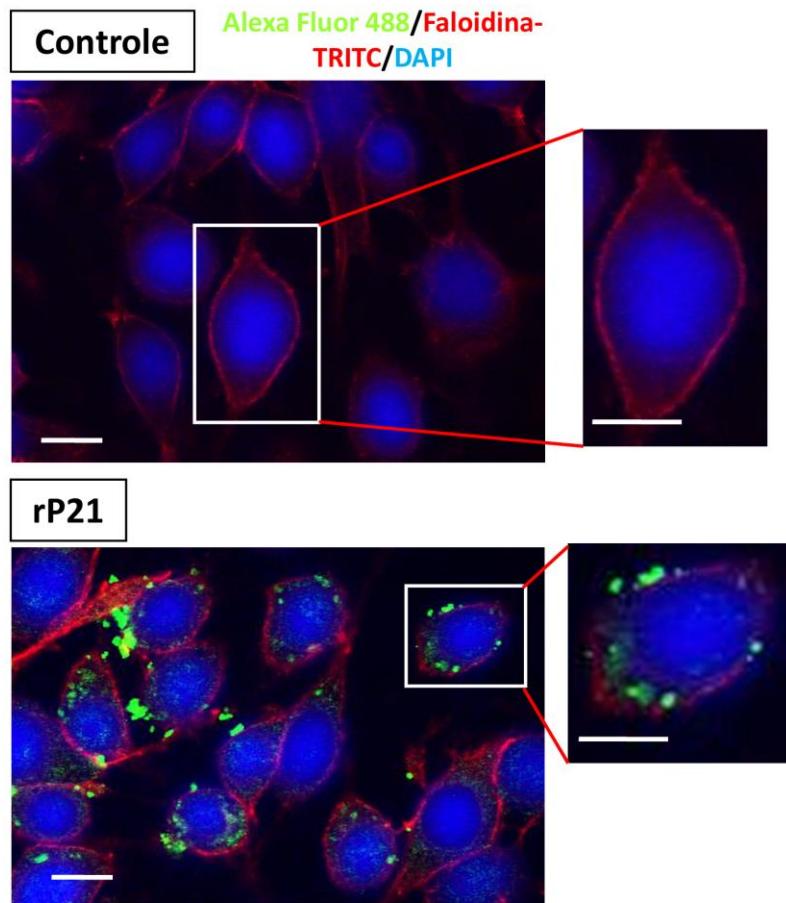


Figura 5. Interação da rP21 com ECs. Células tEnd foram incubadas com rP21 por 24 h. Após, foram marcadas com faloidina-TRITC (vermelho-F-actina), DAPI (azul-núcleo) e anticorpo primário policlonal anti-rP21 feito em coelho seguido de anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa-Fluor 488 (verde-rP21). As imagens demonstram que a rP21 se liga a ECs, sendo internalizada por estas. Células do grupo controle não receberam tratamento com a proteína, porém foram submetidas às mesmas condições de marcação do grupo tratado. As imagens foram analisadas por microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha).

4.3 A atividade antiangiogênica da rP21 depende da sua interação com o receptor CXCR4

Inicialmente, com o intuito de compreender o impacto da interação rP21-CXCR4 em ECs, demonstramos que o receptor CXCR4 é altamente expresso na superfície de células tEnd (células endoteliais) (**Figura 6A**). Em seguida, para avaliar se a inibição da formação de vasos mediada pela rP21 depende da sua ligação ao CXCR4, realizamos um ensaio de formação de vasos em Matrigel. Neste experimento, células tEnd foram tratadas com um antagonista específico do receptor, AMD3100 (inibidor de CXCR4) com subsequente tratamento com ou sem rP21. Observamos que o tratamento com o inibidor de CXCR4 impediu a interação da rP21 com este receptor, impossibilitando assim, a atividade da proteína, o que culminou na formação de vasos. Esse dado é confirmado, pelo fato que o grupo tratado apenas com rP21 teve significante inibição da angiogênese (**Figura 6B**). Portanto, sugerimos que a atividade antiangiogênica da rP21 depende da sua interação com CXCR4.

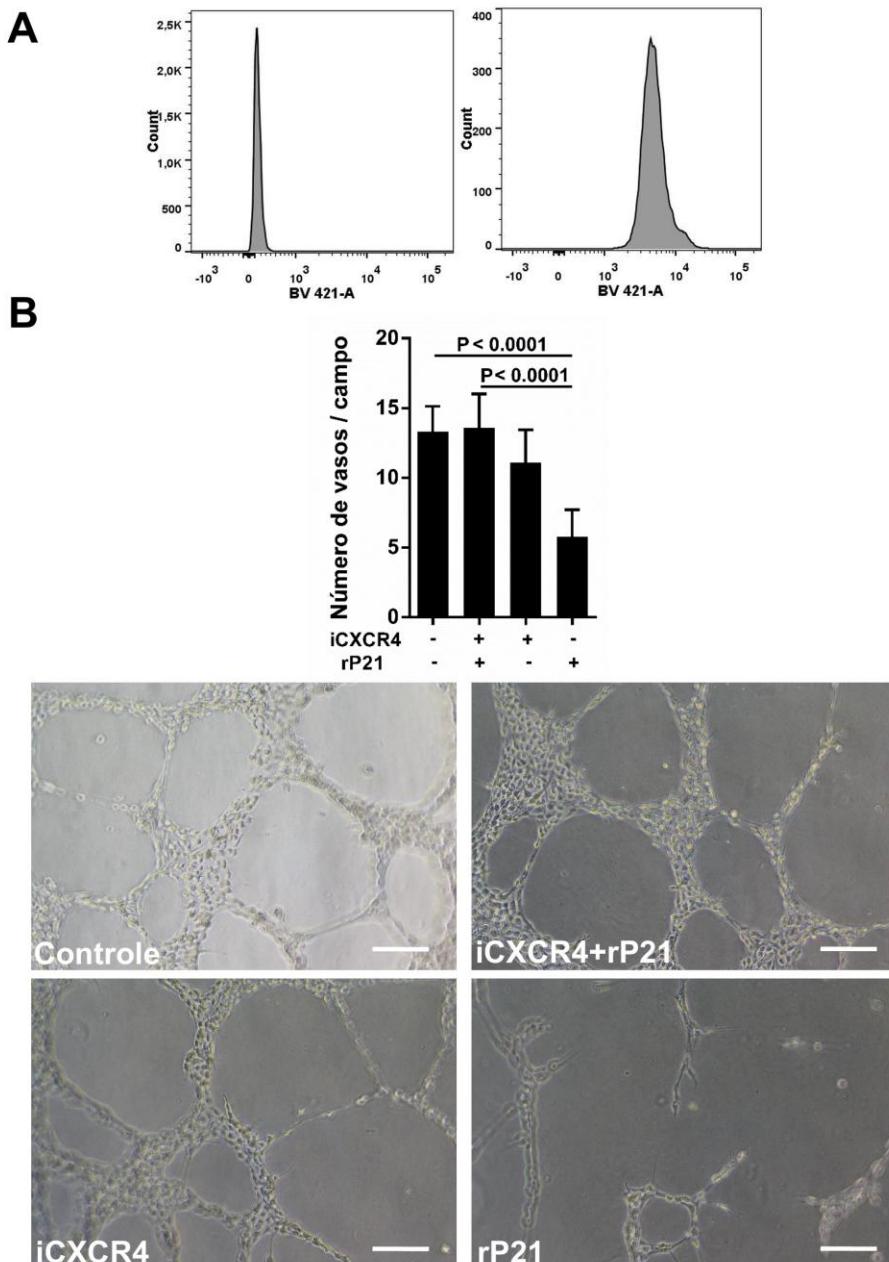


Figura 6. A atividade antiangiogênica da rP21 depende da sua interação com o receptor CXCR4.

(A) Dados de citometria de fluxo mostram a alta expressão do receptor CXCR4 em ECs. (B) Células tEnd foram pré-incubadas com meio de cultura, rP21 (40 μ g/mL), iCXCR4 (30 μ M), iCXCR4 seguido de rP21 por 30 minutos a 5% CO₂ e 37°C. Em seguida, foram plaqueadas sobre uma fina camada de Matrigel. Observamos que o tratamento com o inibidor de CXCR4 com conseguinte adição de rP21 não foi capaz de inibir a formação de vasos, evidenciando assim o papel deste receptor na inibição da angiogênese mediada pela rP21. Imagens representativas de contraste de fase da organização de células tEnd em Matrigel são demonstradas. Em (A) os resultados foram obtidos utilizando *software FlowJo* (versão 7.6.3). Em (B) as diferenças significativas foram determinadas por *one-way ANOVA* e *Tukey's multiple comparisons test* (*GraphPad Prism software*, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. iCXCR4: inibidor de CXCR4 (AMD3100). BV 421-A: *Brilliant Violet 421*

4.4 A rP21 interfere na proliferação e ciclo celular de ECs

Para avaliar a influência da rP21 na proliferação de ECs, células tEnd foram plaqueadas em placa de 96 poços e incubadas com rP21 por 24, 48 e 72 h. Nossos resultados, avaliados pelo método colorimétrico MTT, mostraram que embora a combinação de FBS e bFGF tenha saturado a capacidade de proliferação celular, a rP21 inibiu a proliferação de ECs em 24, 48 e 72 h pós-tratamento (**Figura 7A**).

Para confirmar a atividade antiproliferativa da rP21, realizamos por citometria de fluxo a análise do ciclo celular. Para tal, células tEnd foram plaqueadas e tratadas por 24 h com rP21 e marcadas com iodeto de propídeo. Nossos resultados apontam que a rP21 promove um aumento no número de células na fase S (duplicação do material genético) e uma redução significativa no número de células 4n (fase G2/M), quando comparado com grupo controle (não tratado) (**Figura 7B**). Os mecanismos subsequentes pelo qual a rP21 inibe a proliferação celular serão cuidadosamente avaliados em futuros estudos pelo nosso grupo de pesquisa.

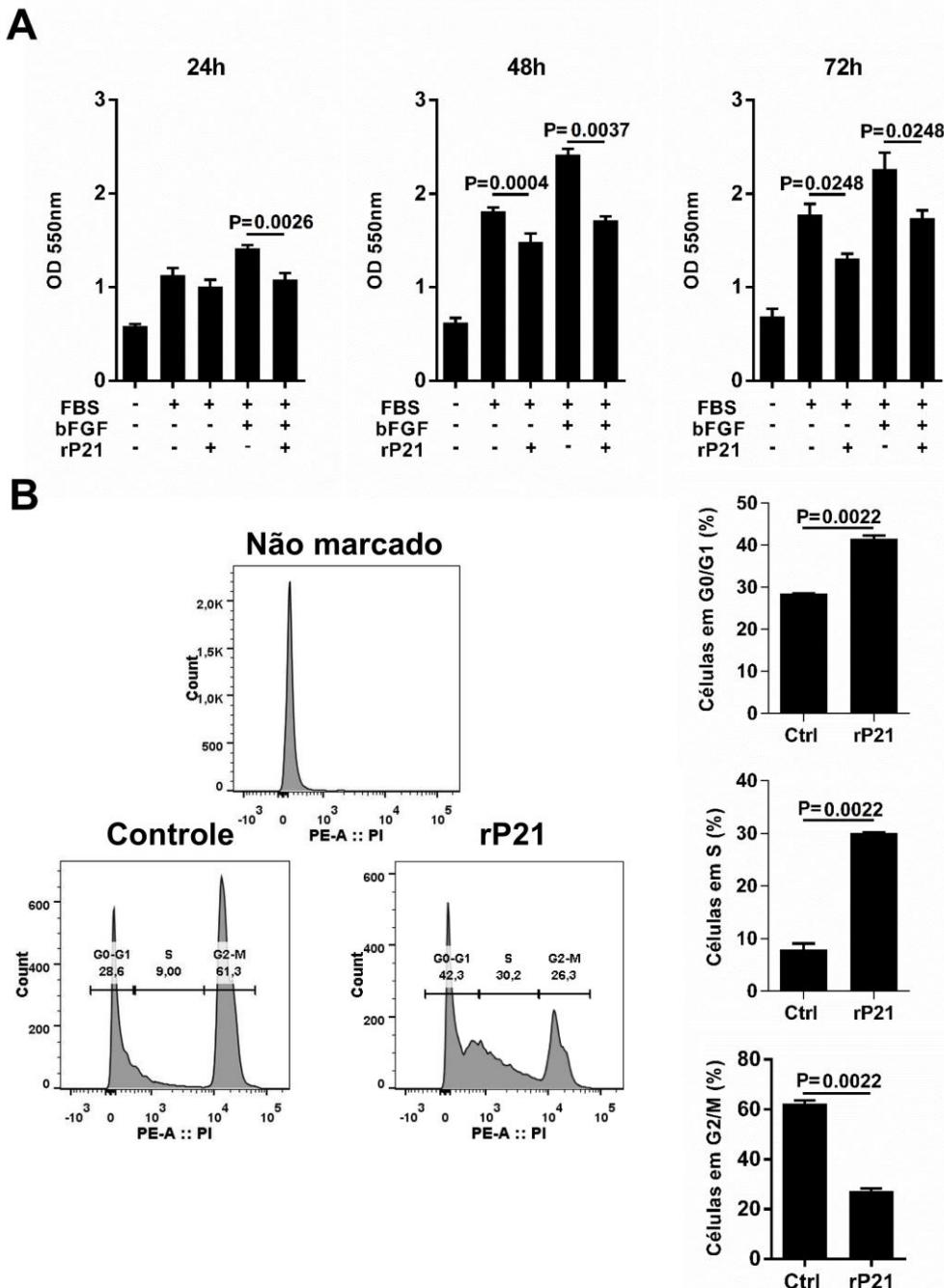


Figura 7. A rP21 interfere na proliferação e ciclo celular de ECs. (A) Células tEnd foram incubadas com rP21 por 24, 48 e 72 h e tiveram sua atividade proliferativa avaliada por MTT. A rP21 inibiu a proliferação de ECs em 24, 48 e 72h pós-tratamento, independe da presença de fatores pró-proliferativos (FBS e bFGF). (B) Células tEnd foram plaqueadas e tratadas por 24 h com rP21 e marcadas com iodeto de propídeo. A rP21 foi capaz de promover um aumento da população de células na fase S e redução do número de células 4n. Diferenças significativas foram determinadas por *one-way* ANOVA e *Tukey's multiple comparisons test* (A); e por *Student's t-test* e *Mann-Whitney test* (B) (*GraphPad Prism software*, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. FBS: *Serum Fetal Bovine*. bFGF: *Basic fibroblast growth factor*.

4.5 Aumento da polimerização do citoesqueleto de actina de ECs tratadas com rP21

Para investigar a influência da rP21 sobre o citoesqueleto de actina de ECs, células tEnd foram plaqueadas em lamínulas circulares em placa de 24 poços e, após adesão, foram tratadas com diferentes concentrações de rP21. Observamos que o tratamento com a proteína promoveu um aumento significativo dos níveis de F-actina nas células quando comparado com o grupo controle (não tratado) (**Figura 8A**). O efeito da rP21 sobre o nível de F-actina pode ser devido a um aumento da taxa de polimerização de actina, uma diminuição na despolimerização de actina ou ambos. Para avaliar qual desses processos são regulados pela rP21, foi realizado um ensaio de recuperação de F-actina utilizando citocalasina-D (CytD). Células tEnd foram tratadas com CytD (1,5 μ M) durante 40 minutos para inibir a montagem de subunidades de actina, seguido por um período de recuperação, na presença ou ausência de rP21. Observamos que a rP21 aumentou a taxa de recuperação dos filamentos de actina em comparação com os grupos controle. Assim, estes resultados mostram que a rP21 tem uma notável capacidade em promover a polimerização de actina em ECs, o que está de acordo com os nossos estudos anteriores (**Figura 8B**) (Rodrigues et al., 2012).

Células tEnd tratadas com rP21 apresentaram uma morfologia do citoesqueleto de actina evidentemente diferente em comparação com as células não tratadas. ECs exibiram fibras de estresse de actina longas, espessas, alinhadas ao longo do eixo longitudinal da célula, com uma membrana plasmática intensamente marcada pela faloidina. Em contraste, as células controle (não tratadas) apresentaram curtos feixes de filamentos de actina, e sua membrana plasmática foi fracamente corada com faloidina. Além disso, células tEnd tratadas com rP21 apresentaram sítios de lamelipódios enriquecidos em F-actina, em comparação com o grupo controle (**Figura 8C - setas brancas**).

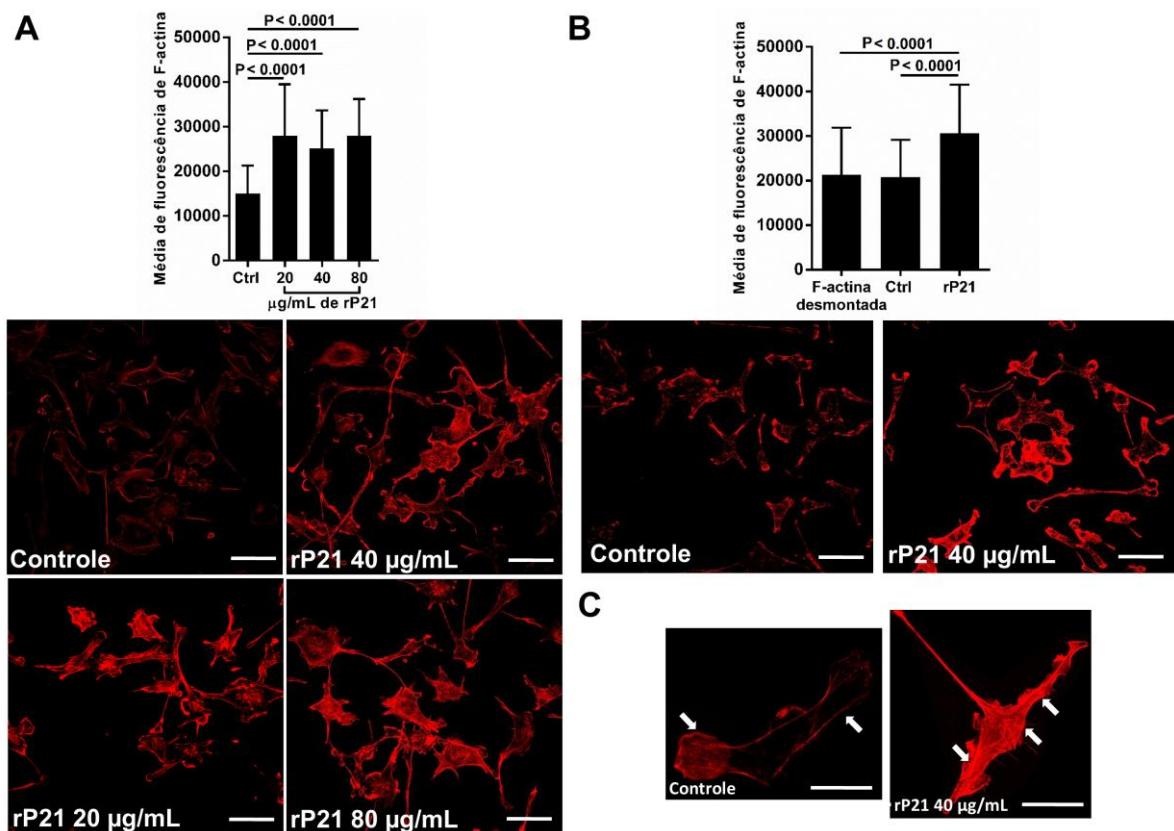


Figura 8. A rP21 promove aumento da polimerização do citoesqueleto de actina em ECs. (A) Diferentes concentrações de rP21 aumentaram significativamente os níveis de F-actina em células tEnd comparado ao grupo não tratado. Imagens representativas mostram F-actina marcada com faloidina nas situações analisadas. (B) A rP21 promoveu uma forte taxa de recuperação dos filamentos de actina comparado aos grupos controles, o que demonstra a habilidade da rP21 em promover a polimerização de actina. Imagens de fluorescência mostram a condição do citoesqueleto de actina após período de recuperação dos filamentos de F-actina na presença de meio de cultura com ou sem rP21. (C) Imagens representativas evidenciando diferenças na morfologia do citoesqueleto de actina, onde células tEnd tratadas com rP21 exibiram espessas fibras de estresse de actina e sítios de lamelipódios ricos em F-actina comprado ao grupo controle (setas em branco). A média de fluorescência da F-actina foi determinada pelo *software ImageJ* (National Institutes of Health, USA). Diferenças significativas foram determinadas por *one-way* ANOVA e *Tukey's multiple comparisons test* (*GraphPad Prism software*, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.6 A rP21 interfere na expressão gênica de proteínas associadas ao citoesqueleto de actina de ECs

Para melhor compreensão do efeito direto da rP21 sobre a dinâmica do citoesqueleto de actina, células tEnd foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas com rP21 ou meio de cultura (grupo controle) durante 24 e 72 h e, a expressão de genes relacionados ao citoesqueleto de actina foi analisada. Nossos resultados, mostram que a rP21 modulou a expressão de 7 importantes genes envolvidos numa série de diferentes processos biológicos, tais como a motilidade celular, migração, morfogênese, interações célula-célula e célula-ECM. A rP21 levou o aumento da expressão de *actin filament-associated protein 1-like 1* (AFAP1L1), cofilina, cortactina, fascina, e兹rina e profilina-1 e reduziu a expressão de *actin filament-associated protein 110 kilodaltons* (kDa) (AFAP-110 / AFAP1) às 24 h pós-tratamento. Curiosamente, em 72 h de tratamento com a rP21, observamos uma inversão na expressão gênica, com exceção da cofilina, profilina-1 e cortactina (**Figura 9**). Além disso, a rP21 não alterou a expressão de gelsolina, moesina e genes do complexo de proteínas relacionadas com a actina 2 e 3 (Arp2/3).

Neste contexto, verificamos se alterações nas propriedades mecânicas do substrato de adesão celular seriam capazes de promover os mesmos efeitos sobre a expressão de genes relacionados com o citoesqueleto de actina nas ECs tratadas com a rP21. Assim, células tEnd foram plaqueadas em placas de 24 poços previamente revestidas com uma fina camada de ECM (Matrigel). Após 24 e 72 h de tratamento com ou sem rP21, o RNA total foi extraído e analisado por RT-qPCR. Observamos diferentes perfis de expressão de genes entre a cultura de células bidimensional (2-D) e a cultura de células tridimensional (3-D). Às 24 h de tratamento em cultura 3-D, a rP21 promoveu uma ligeira diminuição da regulação de AFAP1 e aumento na expressão de gelsolina e moesina. Curiosamente, 72 h pós-tratamento, a rP21 promoveu apenas uma redução da expressão de AFAP1, AFAP1L1, e兹rina e moesina (**Figura 10**). Os níveis de expressão gênica de cofilina, cortactina, fascina, ARP3 e profilina-1 não foram modulados pela rP21 no modelo de cultura celular 3-D.

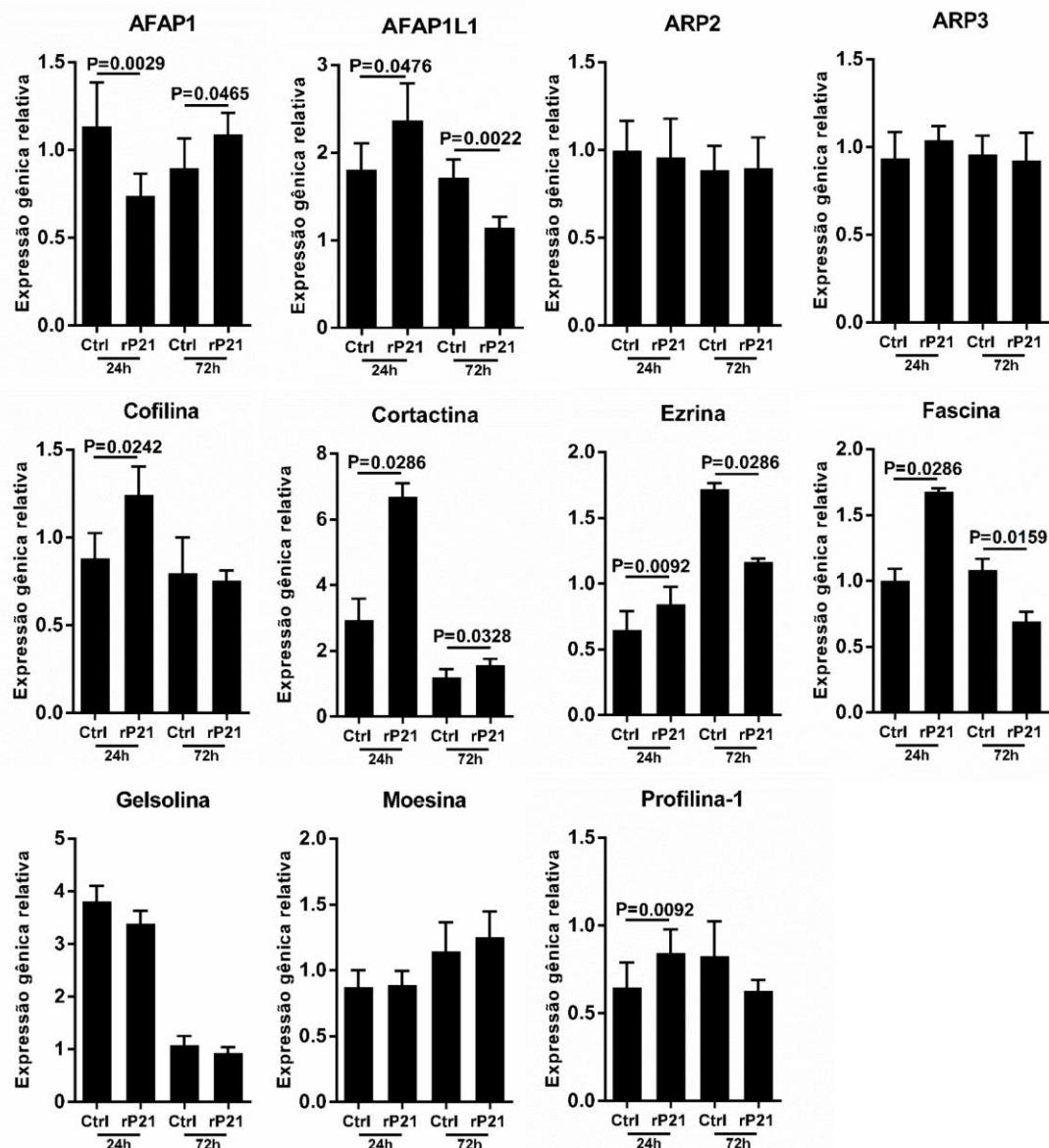


Figura 9. Perfil de expressão gênica de proteínas associadas ao citoesqueleto de actina de ECs incubadas com rP21 e cultivadas em sistema de cultura celular 2-D. Células tEnd foram incubadas com rP21 (40 µg/mL) por 24 e 72 h em cultura celular 2-D e o perfil de expressão gênica foi avaliado por RT-qPCR. A rP21 modulou a expressão de 7 importantes genes envolvidos numa série de diferentes processos biológicos, tais como a motilidade celular, migração, morfogênese, interações célula-célula e célula-ECM. Dados expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Diferenças significativas foram determinadas por *Student's t-test* e *Mann-Whitney test* (*GraphPad Prism software*, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. AFAP1L1: *actin filament-associated protein 1-like 1*. AFAP110 / AFAP1: *actin filament-associated protein 110 kilodaltons (kDa)*.

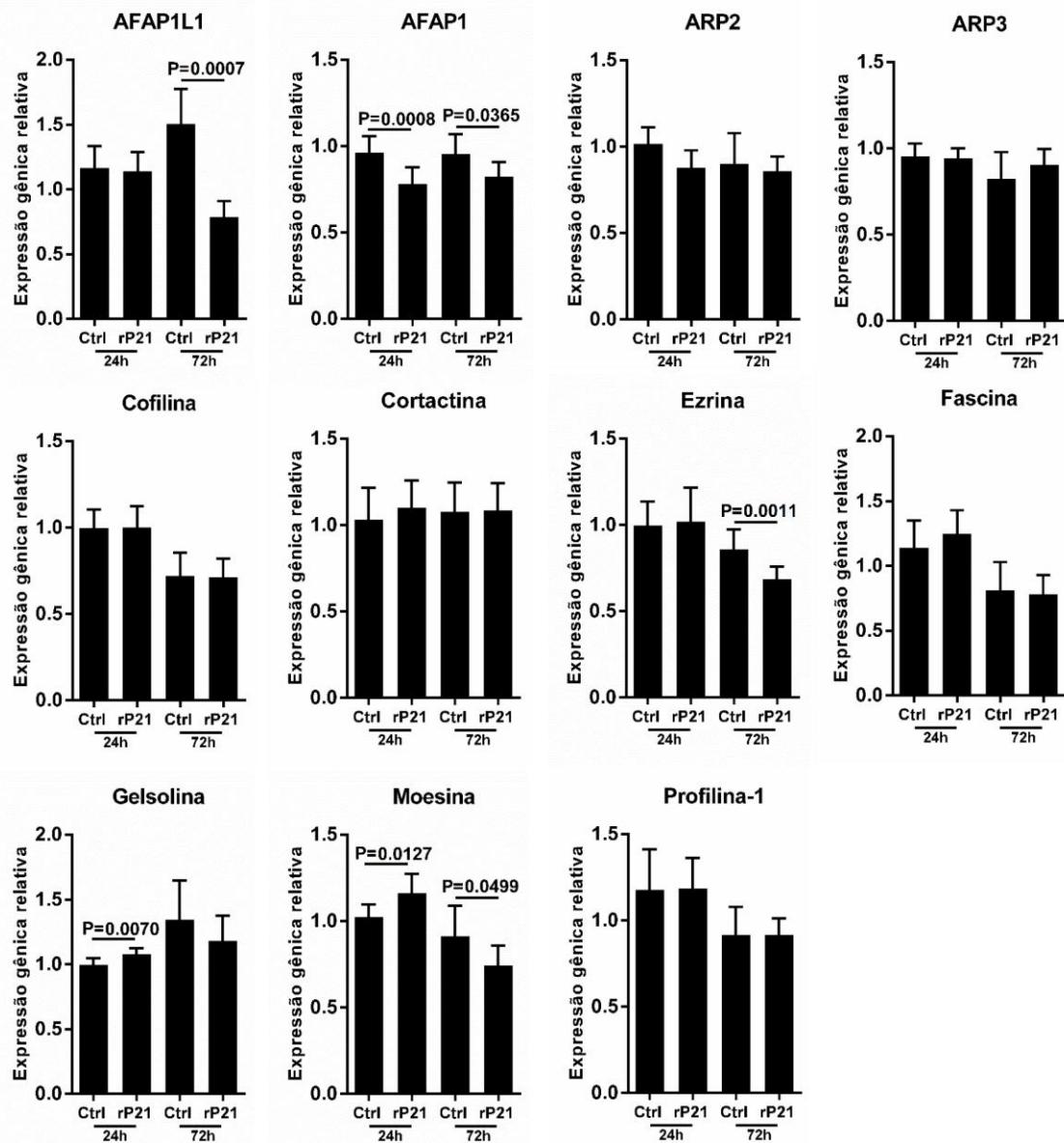


Figura 10. Perfil de expressão gênica de proteínas associadas ao citoesqueleto de actina de ECs incubadas com rP21 e cultivadas em sistema de cultura celular 3-D. Células tEnd foram incubadas com rP21 (40 µg/mL) por 24 e 72 h em cultura celular 3-D e o perfil de expressão gênica foi avaliado por RT-qPCR. A rP21 modulou a expressão dos genes: AFAP1L1, AFAP1, ezrina, gelsolina e moesina. Dados expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Diferenças significativas foram determinadas por *Student's t-test* e *Mann-Whitney test* (*GraphPad Prism software*, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

4.7 A rP21 altera o perfil de expressão gênica de proteínas associadas diretamente à angiogênese

Para avaliar o efeito da rP21 sobre o perfil de expressão gênica de moléculas pro- e antiangiogênicas, células tEnd foram plaqueadas em placa de 24 poços previamente revestidas com uma fina camada de matriz (Matrigel) (sistema 3-D) ou não (sistema 2-D) e incubadas com a rP21 ou meio de cultura (grupo controle) por 24 e 72 h. Após 24 h de tratamento em cultura 2-D, a rP21 aumentou a expressão de *matrix metalloproteinase 9* (MMP9), *vascular endothelial growth factor receptor-1/fms-like tyrosine kinase* (VEGFR1/Flt1) e *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1) e não alterou a expressão de *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA). Às 72 h de tratamento, a rP21 continuou modular positivamente a expressão de sFlt-1 e VEGFR1. Curiosamente, a rP21 promoveu uma modulação positiva da expressão de VEGFA e não interferiu na expressão de MMP9 (**Figura 11A**). Em relação ao sistema de cultura celular 3-D, a rP21 aumentou os níveis de expressão gênica de sFlt-1 às 24 h e MMP9, sFlt-1 e VEGFA às 72 horas e promoveu uma modulação negativa de VEGFA às 24 h e VEGFR1 às 72 h (**Figura 11B**).

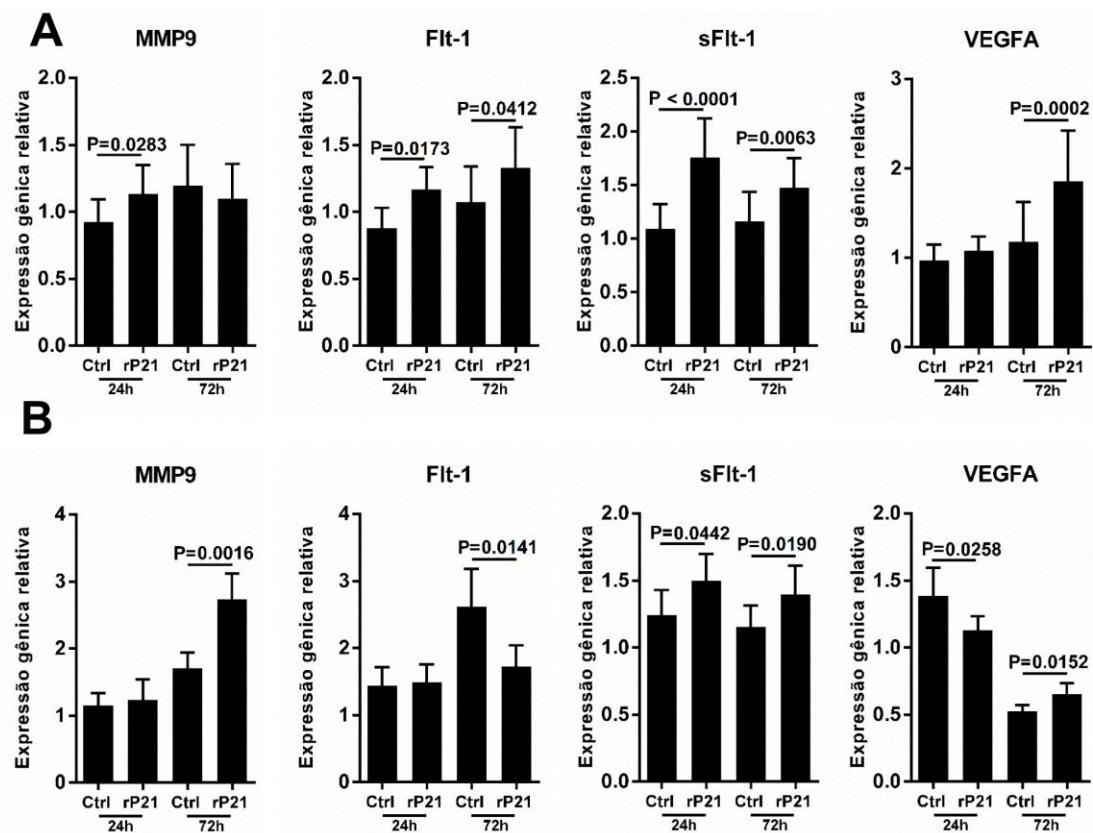


Figura 11. A rP21 modula a expressão gênica de proteínas associadas a angiogênese. O perfil da expressão gênica de moléculas pro- e antiangiogênicas após 24 e 72h de estímulo com rP21 foi analisado por RT-qPCR. (A) Cultura celular 2-D. (B) Cultura celular 3-D. A rP21 foi capaz de modular a expressão de todos os genes analisados ao longo dos tempos avaliados em ambos modelos de cultura celular estudados. Dados expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Diferenças significativas foram determinadas por Student's *t*-test e Mann-Whitney test (GraphPad Prism software, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. MMP9: *matrix metalloproteinase 9*. VEGFR1/Flt1: *Vascular endothelial growth factor receptor-1/fms-like tyrosine kinase*. sFlt-1: *Soluble fms-like tyrosine kinase 1*. VEGFA: *vascular endothelial growth factor A*.

5. Discussão

5.1 A atividade antiangiogênica da rP21 depende de sua interação direta com células endoteliais

A angiogênese consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e apresenta um papel essencial nos processos fisiológicos e patológicos. Os processos básicos durante a angiogênese incluem a degradação enzimática de componentes da ECM, proliferação de ECs, migração celular, tubulogênese e fusão de vasos (POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011; WELTI et al., 2013). De acordo com a literatura, a inibição da angiogênese pode ocorrer por diferentes formas, tais como por degradação de componentes da ECM, regulação negativa de fatores de crescimento, proteases ligadas a membrana, interação direta de uma proteína com ECs o que pode interferir com integrinas (um extenso grupo de receptores estruturais para proteínas da ECM relacionados com a regulação do crescimento celular, sobrevivência e migração durante a angiogênese) (AVRAAMIDES; GARMY-SUSINI; VARNER, 2008).

A ECM regula muitos processos celulares, incluindo crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase, e morfogênese. A ECM é constituída por uma grande variedade de macromoléculas da matriz, tais como colágenos, elastina, fibronectina (FN), lamininas, glicoproteínas, proteoglicanos (PGs), e glicosaminoglicanos (GAGs), que se associam uns com os outros para construir uma complexa rede de matriz tridimensional (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; CLAUSE; BARKER, 2013). Neste sentido, Matriigel (uma mistura solubilizada do sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm) foi utilizado como um componente que mimetiza a ECM, pelo fato de ser composto principalmente de laminina, colágeno tipo IV, nidogênio e proteoglicanos de sulfato de heparano (ESCALANTE et al., 2011).

Nossos resultados mostraram que células endoteliais murinas tratadas com diferentes concentrações de rP21 não exibiram alterações na viabilidade celular ou na aderência destas à uma camada fina de matriz extracelular. Entretanto, a formação de vasos foi inibida após 18 h de incubação com a proteína. As ECs tratadas com B.E. apresentaram inibição da formação de vasos. Entretanto, acreditamos que a citotoxicidade apresentada pelo B.E. seja o fator responsável por tal atividade, o que

foi demonstrado e comprovado (TEIXEIRA et al., 2015). Por essa razão, todos os experimentos seguintes não utilizaram o B.E. como controle experimental.

Uma questão intrigante foi levantada: por qual mecanismo a P21, uma molécula derivada do parasito, é capaz de interferir significativamente no processo de angiogênese? Em ordem para responder essa importante questão, nossos resultados mostraram que a rP21 manteve sua capacidade de inibir a formação de vasos ao longo dos tempos de 24, 48 e 72 h pós-tratamento. Entretanto, quando avaliamos a atividade da rP21 sobre importantes substratos que mimetizam a ECM, esta proteína não mostrou atividade significativa. Embora a rP21 não interfira com a adesão e viabilidade de ECs e não exiba atividade proteolítica sobre componentes da ECM, esta proteína inibe fortemente a formação de vasos. Este efeito antiangiogênico da rP21 pode ser explicado por outros mecanismos, tais como uma interação direta da rP21 com as ECs, o que nossos resultados apontam. Sendo assim, nossos dados sugerem que a interação rP21-EC pode desencadear uma cascata de eventos intracelulares que culminaria na inibição da formação de vasos.

5.2 A interação entre rP21-CXCR4 diminui a formação de vasos e inibe a proliferação de ECs

CXCL12 [Fator-1 derivado de célula estromal (SDF-1)] é uma quimiocina que se liga principalmente ao receptor CXCR4. A secreção de CXCL12 está associada a danos nos tecidos, tais como o enfarte cardíaco e a isquemia focal, por promover a reparação de vasos. CXCR4 é expresso em linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais e epiteliais. Este receptor é amplamente expresso por células endoteliais em tecidos danificados, tais como em artérias carótidas e placas ateroscleróticas lesionadas, durante processos patológicos (RATAJCZAK et al., 2006; TEICHER; FRICKER, 2010). Sabe-se que as células pró-angiogênicas CXCR4⁺ são recrutadas para tecidos danificados ao longo de um gradiente de CXCL12 para promover a revascularização de áreas lesionadas, o que evidencia a importância do eixo CXCL12/CXCR4 durante processos inflamatórios e o papel pro-angiogênico de CXCL12 (LIANG et al., 2007; PETIT; JIN; RAFII, 2007).

A CCC é marcada por um intenso processo inflamatório que é clinicamente persistente em pacientes chagásicos indeterminados e crônicos, a qual caracteriza-se essencialmente por uma miocardite (ANDRADE et al., 1997). A prevalência de

miocardite se correlaciona com a gravidade da insuficiência cardíaca clínica, tais como espasmos vasculares, diminuição do fluxo sanguíneo, isquemia do miocárdio, angiografia coronária, insuficiência de vasodilatação coronária dependente do endotélio, trombos de plaquetas e um aumento da agregação plaquetária (ARREAZA et al., 1983; FEIT; EL-SHERIF; KOROSTOFF, 1983; HIGUCHI et al., 1987; HAGAR; RAHINTOOLA, 1991; TORRES et al., 1995).

Nossos resultados mostraram que a inibição da angiogênese mediada pela rP21 depende de sua ligação direta com o receptor CXCR4. Além disso, também verificamos que o tratamento com rP21 promove a inibição da proliferação celular. Curiosamente, tomado em conjunto, nossos resultados indicam que a rP21 antagoniza a ação de CXCL12, já que esta importante quimiocina está associada a processos pro-angiogênicos e pro-proliferativos (KUMAR, 2010; SHEN et al., 2013; BEGLEY et al., 2015; MAJ et al., 2015).

Nesse sentido, acreditamos que a isquemia microvascular observada durante a CCC possa ser parcialmente explicada pelo papel ativo da P21. Parasitos intracelulares podem constantemente secretarem P21 a qual entraria no espaço extracelular e se ligaria a ECs CXCR4⁺ presentes no coração. Além disso, ECs atraídas pela P21, perderiam também sua capacidade de promover a revascularização *in situ*, o que contribuiria para a progressão da doença. Esta hipótese é parcialmente apoiada por vários estudos independentes, os quais mostraram que a persistência de *T. cruzi* está diretamente associada à patogênese da CCC. Por exemplo, Andrade et al. (1987) e Silva e Rossi (1990) relataram que uma carga parasitária reforçada agrava o curso da cardiomiopatia. Além disso, Añes e colaboradores (1999) demonstraram que amastigotas intactas são capazes de sobreviver e multiplicar-se no interior do tecido do coração no hospedeiro vertebrado durante a fase crônica.

5.3 A rP21 induz a polimerização do citoesqueleto de actina e modula a expressão de genes relacionados com a actina em ECs

A actina é um importante componente do citoesqueleto de ECs o qual está relacionado com o controle da angiogênese (BAYLESS; JOHNSON, 2011). O citoesqueleto de actina orquestra várias etapas tanto na angiogênese fisiológica quanto na patológica, o que requer uma remodelação contínua dependente do citoesqueleto (CARMELIET, 2003; CARMELIET, 2004). Assim, a rede de actina e suas proteínas

associadas integram com vias de sinalização chave conhecidas por regular a angiogênese (THOENES; GUNTHER, 2008).

A regulação dinâmica do citoesqueleto de actina desempenha um papel central numa variedade de eventos celulares e envolve uma série de proteínas de ligação à actina (ABPs) (DORFLEUTNER et al., 2007). Cofilina é uma pequena proteína ubíqua capaz de se ligar à actina monomérica (G) e filamentosa (F), a qual regula a dinâmica da polimerização de actina e despolimerização em células migratórias (CARLIER et al., 1997; MOUNEIMNE et al., 2004; HOTULAINEN et al., 2005; CAO et al., 2006; SUN et al., 2007). Vários estudos têm mostrado que a cofilina é necessária para determinar a direção da migração das células por meio de protrusões baseadas na polimerização de actina (MOUNEIMNE et al., 2004; SIDANI et al., 2007; OSER; CONDEELIS, 2009). Cortactina, outra ABP, localiza-se no citoplasma de células e está associada com o rearranjo e polimerização do citoesqueleto de actina, principalmente na periferia do córtex celular (COSEN-BINKER; KAPUS, 2006; AMMER; WEED, 2008). Esta proteína desencadeiaativamente a formação de lamelipódios, que são protuberâncias da membrana plasmática caracterizadas por elevados níveis de F-actina. Semelhante a cofilina, a cortactina também está envolvida na motilidade celular (WEED; PARSONS, 2001). A fascina é uma proteína localizada em protrusões ricas em actina de ECs e está envolvida na regulação de estruturas do citoesqueleto durante a adesão e migração celular (SEDEH et al., 2010).

AFAP1 e AFAP1L1 são membros da família AFAP de proteínas; são consideradas proteínas adaptadoras (proteínas não-enzimáticas) associadas com a montagem e desmontagem do citoesqueleto de actina (FINCHAM et al., 1996, FRAME; BRUNTON, 2002), adesão celular, invasão e motilidade (YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009). Snyder et al. (2011) mostraram que o aumento na expressão de AFAP1 e AFAP1L1 promove a formação de lamelipódios na ausência de sinais extracelulares. Além disso, estes resultados indicam que AFAP1L1, como AFAP1, está associada com a formação de fibras de estresse de actina. Neste trabalho, os autores demonstraram que AFAP1L1 tem a capacidade de se ligar a cortactina formando um complexo, o que não foi observado com AFAP1. Assim, estas proteínas podem ter a capacidade de interagir com diferentes proteínas envolvidas na dinâmica do citoesqueleto de actina. Ezrina, radixina e moesina, formam a família de proteínas ERM, que agem como ligantes entre a membrana plasmática e os filamentos de actina

corticais e estão envolvidas em muitas funções fisiológicas, incluindo a regulação do citoesqueleto de actina, controle do formato celular, adesão, formação de lamelipódios, motilidade e a modulação de vias de transdução de sinal. Ezrina desempenha um papel fundamental nas funções celulares baseadas na actina necessárias para a locomoção celular, que são importantes eventos na angiogênese (TSUKITA et al., 1994; HALON; DONIZY, 2012).

A literatura científica tem demonstrado que diferentes ABPs desempenham um papel crítico na regulação de uma complexa série de eventos de sinalização em ECs durante a migração e a angiogênese. Neste contexto, observamos que células cultivadas em cultura 2-D e tratadas com rP21 tiveram um aumento na expressão de genes que codificam proteínas necessárias para a polimerização de actina, formação de fibras de estresse e migração celular, como por exemplo cofilina, cortactina, AFAP1, AFAP1L1, fascina e ezrina. Entretanto, quando os níveis de expressão gênica oriundos de células cultivadas em um modelo de cultura celular 3-D foram determinados, os mesmos genes que tiveram um aumento de sua expressão em cultura 2-D não apresentaram alteração em sua expressão ou foram modulados negativamente pelo tratamento com a rP21, com exceção de gelsolina e moesina em 24 h, que apresentaram uma redução de sua expressão. Curiosamente, a expressão de ezrina em 3-D (proteína da família ERM) foi significativamente reduzida em 72 h. A modulação negativa de ezrina pode estar diretamente relacionada com a inibição da formação de vasos. Esta hipótese é corroborada por Zhao et al. (2016), que mostrou que o silenciamento do gene ezrina em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUEVCs) *in vitro* suprimiu a migração e a angiogênese.

Sabe-se que a organização do citoesqueleto dentro de uma EC é diferente de um modelo de cultura 2-D para um modelo 3-D (PELHAM; WANG, 1997; LO et al., 2000; KNIAZEEVA; PUTNAM, 2009; LI et al., 2010; BAYLESS; JOHNSON, 2011; PAL; KLEER, 2014). Crescentes evidências a partir de sistemas 2-D tem sugerido que substratos mecânicos (rígidos substratos de vidro ou poliestireno) promovem mudanças na migração, proliferação, diferenciação e formato celular. No entanto, ainda não está claro se esses processos fisiológicos podem ser extrapolados para culturas 3-D ou em sistemas *in vivo* (PELHAM; WANG, 1997; LO et al., 2000; PEYTON et al., 2007). Isto é claramente observado quando ECs estendem extensos prolongamentos sobre uma ECM intacta em cultura 3-D, ao passo que estas mesmas células formam uma

monocamada fina sobre um substrato mecânico. Portanto, ECs comportam-se diferentemente quando cultivadas em culturas 3-D, em comparação com culturas 2-D (BAYLESS; JOHNSON, 2011). Neste sentido, as diferenças nos perfis de expressão gênica observadas em nossos resultados pode ser devido a mudanças no substrato, que podem diretamente ou indiretamente influenciar no direcionamento da miosina, contratilidade mediada pela actina, motilidade celular, interação célula-célula e/ou vias de sinalização intracelular (KNIAZEEVA; PUTNAM, 2009).

5.4 A rP21 modula a expressão de genes diretamente associados à angiogênese

A angiogênese é controlada pelo equilíbrio entre vários sinais pro- e antiangiogênicos. MMP9 é uma enzima expressa em muitos tipos de células, incluindo ECs, e apresenta a capacidade de degradar moléculas presentes na ECM. Vários estudos têm mostrado que esta metaloproteinase está implicada em processos pro-angiogênicos (ITOH et al., 1998; VU et al., 1998; FANG et al., 2000; ZHOU et al., 2000). No entanto, o papel de MMP9 permanece incerto durante o processo angiogênico (BENDECK, 2004).

VEGFA pertence à família *mammalian platelet-derived growth factor* (PDGF) e atua como uma potente e multifuncional citocina que induz a formação de colônias através do recrutamento de subconjuntos de células maduras. Também apresenta um papel ativo na regulação do crescimento fisiológico e patológico dos vasos sanguíneos formados durante processos angiogênicos e vasculogênicos (IVY; WICK; KAUFMAN, 2009). A molécula VEGFA se liga ao VEGFR1 com uma afinidade que é aproximadamente 10 vezes maior do que ao Flk-1 / KDR (VEGFR2) (SHIBUYA; CLAESSEN-WELSH, 2006). VEGFR1 e VEGFR2 são membros da família tirosina-quinase (TK) de VEGFR e são altamente expressos em ECs. Apesar de ambos os receptores TK estarem envolvidos na formação de vasos sanguíneos, o preciso papel biológico do Flt-1/VEGFR1 neste processo ainda permanece não totalmente elucidado. Flt-1 sofre *splice* alternativo para produzir tanto uma forma localizada na membrana (Flt-1) quanto uma forma solúvel (sFlt-1) que são secretadas por ECs. Shibuya e Claesson-Welsh (2006) mostraram que camundongos *knockout* para VEGFR1 exibiram um crescimento excessivo e disforme dos vasos sanguíneos, o que sugere que VEGFR1 é um regulador negativo da angiogênese durante o desenvolvimento embrionário.

Takeda et al. (2009) também revelaram o papel de regulação negativa de Flt-1, tal como camundongos *knockout* para VEGFR1 exibiram letalidade embrionária devido ao crescimento excessivo das células endoteliais e disfunção dos vasos sanguíneos. Além disso, Amano et al. (2015) mostrou que camundongos *knockout* para o domínio TK intracelular de VEGFR1 exibiram angiogênese alterada após uma isquemia dos membros posteriores, indicando que a sinalização VEGFR1 é essencial para uma revascularização relacionada à processos isquêmicos. Além disso, sabe-se que o sFlt-1 mantém alta afinidade para VEGFA (KENDALL et al., 1996; MURDOCH et al., 2014) e pode capturar VEGFA em ordem para impedi-lo de se ligar ao VEGFR1. Estes resultados sugerem que sFlt-1 modula a quantidade de VEGFA (ROBERTS et al., 2004) e inibe a atividade de VEGFA sem afetar as vias de sinalização intracelular de VEGFR (AMANO et al., 2015). Assim, Flt-1 regula negativamente a angiogênese através do seu domínio extracelular e regula positivamente a angiogênese através do seu domínio TK.

De acordo com nossos resultados do sistema de cultura celular 3-D, sugerimos que a atividade antiangiogênica da rP21 às 24 h está relacionada com uma regulação positiva da expressão de sFlt-1 e da modulação negativa de VEGFA. No entanto, às 72 h, observamos uma diminuição na expressão de sFlt-1 e aumento de VEGFA e MMP9 em ECs tratadas com rP21. Curiosamente, neste período de tempo, observamos que a rP21 regulou negativamente a expressão de Flt-1, o que poderia estar diretamente relacionado com a inibição da formação de vasos, o que está de acordo com estudos acima mencionados. Neste sentido, a inibição inicial da angiogênese pela rP21 às 24 h poderia explicar o aumento dos níveis sFlt-1 e a inibição continuada da angiogênese às 72 horas está provavelmente relacionada com a regulação negativa de Flt-1. No sistema de cultura 2-D, a rP21 regulou positivamente sinais pro- e antiangiogênicos. No entanto, sabe-se que as células possuem diferentes comportamentos dependendo das condições do ambiente de cultura celular ao qual são submetidas.

5.5 Mecanismo mediado pela P21 durante a patogênese da CCC

Combinando nossos resultados com a literatura científica, hipotetizamos que um mecanismo antiangiogênico é desencadeado pela P21 durante a etiologia e progressão da CCC. Propomos que a P21 é continuamente secretada para o espaço extracelular

pelas formas amastigotas de *T. cruzi* localizadas no interior das fibras cardíacas, o que induz o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação e leva ao aumento da produção de interleucina-4 (IL-4) (TEIXEIRA et al., 2015). Sabe-se que a IL-4 induz macrófagos a adquirirem uma ativação alternativa (M2), que se caracterizam pelo aumento da produção de sFlt-1 (molécula antiangiogênica) (WU et al., 2015). Além disso, acreditamos que a P21 apresenta a capacidade de se ligar tanto à ECs CXCR4⁺ presentes no coração, quanto àquelas ECs quimioatraídas durante o processo de inflamação em ordem para promover a revascularização do tecido danificado. Neste sentido, a ligação da P21 à ECs via receptor CXCR4 *in situ* promoveria a inibição da atividade pro-angiogênica destas células através de uma cascata de eventos intracelulares, tais como a inibição da proliferação de ECs, modulação positiva de sFlt-1 e regulação negativa de Flt-1, AFAP1, AFAP1L1, e兹rina e moesina, o que poderia explicar parcialmente as anormalidades micro-vasculares funcionais e estruturais observadas durante a CCC (MARIN-NETO et al., 2007).

Diante de todas as propriedades apresentadas pela P21, tanto mencionadas neste trabalho quanto em artigos já publicados, nosso grupo de pesquisa através da metodologia de *Phage Display* propôs encontrar peptídeos que poderiam se ligar a P21 (bloqueando seus sítios de ligação), visando a diminuição de suas atividades biológicas. Neste sentido, foram encontrados quatro peptídeos com alta afinidade pela proteína, denominados de A11, B2, B10 e C2. Testando as atividades biológicas destes peptídeos, verificamos que formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) quando pré-tratadas com os peptídeos A11 e B2, tiveram uma redução significativa na capacidade de invasão celular, evidenciando uma inibição parcial da atividade da P21 nativa secretada pelos parasitos (dados não publicados).

Neste trabalho verificamos que a rP21 apresenta evidente atividade antiangiogênica *in vitro* e *in vivo*, sendo potencialmente importante no desenvolvimento da CCC. Neste contexto, avaliamos atividade inibitória de um peptídeo sintético sobre a atividade antiangiogênica da rP21. Verificamos que células tEnd pré-incubadas simultaneamente com o peptídeo e a rP21, apresentaram uma formação de vasos normal, quando comparado com os grupos controles (dados não publicados). Entretanto, mais experimentos ainda serão realizados para comprovar essa atividade.

Diante das importantes atividades biológicas apresentadas pela P21 e os peptídeos, atualmente nosso grupo de pesquisa tem se empenhado em buscar

possibilidades alternativas no tratamento da doença de Chagas, visando trazer melhores condições de vida para pacientes chagásicos que ainda enfrentam, nos dias de hoje, uma difícil realidade.

6. Conclusão

Ao término deste trabalho, concluímos que a proteína recombinante 21 de *T. cruzi* apresentou uma alta capacidade em inibir a formação de vasos sanguíneos, o que foi demonstrado através de modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*. Verificamos que a rP21 não apresentou citotoxicidade e inibição da adesão de ECs. Entretanto, ensaios de formação de vasos em Matrigel revelaram que a rP21 inibe significativamente a formação de vasos. Somado a estes resultados, utilizando modelos murinos demonstramos que a rP21 promoveu uma redução no conteúdo de hemoglobina, o que foi comprovado através da diminuição no número de vasos sanguíneos em cortes histológicos. Além disso, mostramos também que essa inibição mediada pela rP21 se dá por uma interação direta com as ECs via receptor CXCR4, não possuindo uma atividade proteolítica sobre os componentes da ECM.

Buscando melhor compreender o impacto da interação rP21-CXCR4 em ECs, mostramos que essa interação culminou em uma inibição da proliferação celular e redução do número de células na fase G2/M. Além disso, verificamos que o sistema de cultura celular 3-D consegue representar de forma mais fidedigna os eventos desencadeados pela rP21. Nesse contexto, vimos que o tratamento com a rP21 levou à uma modulação positiva de sFlt-1 e regulação negativa de Flt-1, AFAP1, AFAP1L1, ezrina e moesina, o que poderia parcialmente explicar a atividade antiangiogênica desencadeada pela rP21.

7. Referências bibliográficas

ABUHAB, A.; TRINDADE, E.; AULICINO, G.B.; FUJII, S.; BOCCHI, E.A.; BACAL, F. Chagas' cardiomyopathy: the economic burden of an expensive and neglected disease. *Int. J. Cardiol.*, v. 168(3), p. 2375-2380, 2013.

ACHÊ, D.C.; GOMES, M.S.; DE SOUZA, D.L.; SILVA, M.A.; BRANDEBURGO, M.I.; YONEYAMA, K.A.; RODRIGUES, R.S.; BORGES, M.H.; LOPES, D.S.; RODRIGUES VDE, M. Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: Inhibition of cell adhesion and angiogenesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 72, p. 445-453, 2014.

ALVES, M.J.; MORTARA, R.A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104 (Suppl. 1), p.76-88, 2009.

AMANO, H.; KATO, S.; ITO, Y.; ESHIMA, K.; OGAWA, F.; TAKAHASHI, R.; SEKIGUCHI, K.; TAMAKI, H.; SAKAGAMI, H.; SHIBUYA, M.; MAJIMA, M. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Signaling in the Recovery from Ischemia. **PLoS One**. 10(7):e0131445. doi: 10.1371/journal.pone.0131445, 2015.

AMMER, A.G.; WEED, S.A. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. **Cell Motil. Cytoskeleton.**, v. 65, p. 687–707, 2008.

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.**, v. 68, p. 755–766, 1987.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.; CHIARI, E.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, v. 100, p. 269-275, 2002.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. **Am. J. Pathol.**, v. 127, p. 467– 473, 1987.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M.; WENTHOLD JR, R.J.; HILBERT, S.L.; FERRANS, V.J. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterizaton of cardiac changes in the canine model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p. 328 –336, 1997.

AÑEZ, N., CARRASCO, H., PARADA, H., CRISANTE, G., ROJAS, A. FUENMAYOR, C., GONZALEZ, N., PERCOCO, G., BORGES, R., GUEVARA, P.; RAMIREZ, J.L. Myocardial parasite persistence in chronic Chagasic patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, p. 726 –732, 1999.

ARAUJÓ, N.S. **Expressão diferencial da proteína P21 em *Trypanosoma cruzi*: novas peças para a compreensão do parasita e seu impacto sobre a infecção**. Uberlândia: UFU, 2014. 67. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

ARREAZA, N.; PUIGBÓ, J.J.; ACQUATELLA, H.; CASAL, H.; GIORDANO, H.; VALECILLOS, R.; MENDOZA, I.; PEREZ, J.F.; HIRSCHHAUT, E.; COMBELLAS. I. Radionuclide evaluation of left ventricular function in chronic Chagas' cardiomyopathy. **J. Nucl. Med.**, v. 24, p. 563–567, 1983.

AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L.E. Jr; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year Record of Chagas's disease. **PNAS**, v. 101, p. 2034-2039, 2004.

AVRAAMIDES, C.J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J.A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, p. 604-617, 2008.

BARRETO, M.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 89-151.

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. **Methods in Enzymology**, v. 162, p. 327-334, 1988.

BÄUMER, N.; APPEL, N.; TERHEYDEN, L.; BUCHHOLZ, F.; ROSSIG, C.; MÜLLER-TIDOW, C.; BERDEL, W.E.; BÄUMER, S. Antibody-coupled siRNA as an efficient method for in vivo mRNA knockdown. **Nat. Protoc.**, v. 11, p. 22-36, 2016.

BAYLESS, K.J.; JOHNSON, G.A. Role of the cytoskeleton in formation and maintenance of angiogenic sprouts. **J. Vasc. Res.**, v. 48, p. 369-385, 2011.

- BEGLEY, L.A.; KASINA, S.; SHAH, R.B.; MACOSKA, J.A. Signaling mechanisms coupled to CXCL12/CXCR4-mediated cellular proliferation are PTEN-dependent. **Am. J. Clin. Exp. Urol.**, v. 8, p. 91-99, 2015.
- BEHBEHANI, K. Developmental cycles of *Trypanosoma (Schyzotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909) in mouse peritoneal macrophages in vitro. **Parasitology**, v. 66, p. 343-353, 1973.
- BENDECK, M.P. Macrophage matrix metalloproteinase-9 regulates angiogenesis in ischemic muscle. **Circ. Res.**, v. 94, p. 138-139, 2004.
- BENVENUTI, L.A.; ROGGERIO, A.; FREITAS, H.F.; MANSUR, A.J.; FIORELLI, A.; HIGUCHI, M.L. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 102, p. 481-487, 2008.
- BILATE, A.M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 67-74, 2008.
- BRADFORD, M.M. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 347-382, 1973.
- BUSSOLINO, F.; DE ROSSI, M.; SICA, A.; COLOTTA, F.; WANG, J.M.; BOCCHIETTO, E.; PADURA, I.M.; BOSIA, A.; DE JANA, E.; MANTOVANI, A. Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. **J. Immunol.**, v. 147, p. 2122-2129, 1991.
- CAO, W.; GOODARZI, J.P.; DE LA CRUZ, E.M. Energetics and kinetics of cooperative cofilin-actin filament interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 361, p. 257-267, 2006.
- CARLIER, M.F.; LAURENT, V.; SANTOLINI, J.; MELKI, R.; DIDRY, D.; XIA, G.X.; HONG, Y.; CHUA, N.H.; PANTALONI, D. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. **J. Cell Biol.**, v. 136, p. 1307-1322, 1997.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat. Med.**, v. 9, p. 653-660, 2003.
- CARMELIET, P. Manipulating angiogenesis in medicine. **J. Intern. Med.**, v. 255, p. 538-561, 2004.
- CARVALHO, A.C.C.; GOLDENBERG, R.C.S.; JELICKS, L.A.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R.; SPRAY, D.C.; TANOWITZ, H.B. Cell Therapy in Chagas Disease. **Interd. Perspc. Infect. Dis.**, v. 2, p. 1-6, 2009.
- CASTILLO-RIQUELME, M.; GUHL, F.; TURRIAGO B.; PINTO, N.; ROSAS, F.; MARTÍNEZ, M.F.; FOX-RUSHBY, J.; DAVIES, C.; CAMPBELL-LENDRUM, D. The costs of preventing and treating Chagas disease in Colombia. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, p. 1-11, 2008.
- CLAUSE, K.C.; BARKER, T.H. Extracellularmatrix signaling in morphogenesis and repair. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 24, p. 830-833, 2013.
- CORTEZ, M.R.; MONTEIRO, F.A.; NOIREAU, F. New insights on the spread of *Triatoma infestans* from Bolivia—Implications for Chagas disease emergence in the Southern Cone. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 350-353, 2010.
- COSEN-BINKER, L.; KAPUS, A. Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 352-361, 2006.
- COSSIO, P.M.; DAMILANO, G.; DE LA VEGA, M.G.; LAGUENS, M.T.; CABEZA MECKERT, P.; DIEZ, C.; ARANA R.M. In vitro interaction between lymphocytes of chagasic individuals and heart tissue. **Medicina (B Aires)**, v. 36, p. 287-293, 1976.

CRISSMAN, H.A.; STEINKAMP, J.A. Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J. Cell Biol.*, v. 59, p. 766, 1973.

DE CARVALHO, T.U.; DE SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 28, n. 4, p. 205-212, 1986.

DE OLIVEIRA, D.G.; MURAKAMI, M.T.; CINTRA, A.C.; FRANCO, J.J.; SAMPAIO, S.V.; ARNI, R.K. Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, v. 41(1), p. 21-29, 2009.

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

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-126.

DIAS, J.C.P.; NETO, P.V.A.; LUNA, E.J.A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 375-379, 2011.

DORFLEUTNER, A.; STEHLIK, C.; ZHANG, J.; GALLICK, G.E; FLYNN, D.C. AFAP-110 is required for actin stress fiber formation and cell adhesion in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J. Cell Physiol.*, v. 213, p. 740-749, 2007.

DOS SANTOS, M.A.; TEIXEIRA, F.B.; MOREIRA, H.H.; RODRIGUES, A.A.; MACHADO, F.C.; CLEMENTE, T.M.; BRIGIDO, P.C.; SILVA, R.T.; PURCINO, C.; GOMES, R.G.; BAHIA, D.; MORTARA, R.A.; MUNTE, C.E.; HORJALES, E.; DA SILVA, C.V. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. *Sci. Rep.*, v. 4, p. 4259, 2014. doi: 10.1038/srep04259.

DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 21, p. 287-292, 2008.

DUTRA, W.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; CANÇADO, J.R.; PINTO-DIAS, J.C.; BRENER, Z.; FREEMAN JÚNIOR, G.L.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G.; PARRA J.C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int. Immunol.*, v. 6, p. 499-506, 1994.

ESCALANTE, T.; ORTIZ, N.; RUCAVADO, A.; SANCHEZ, E.F.; RICHARDSON, M.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. *PLoS One*, v. 6, p. 1-13, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0028017.

FANG, J.; SHING, Y.; WIEDERSCHAIRN, D.; YAN, L.; BUTTERFIELD, C.; JACKSON, G.; HARPER, J.; TAMVAKOPOULOS, G.; MOSES, M.A. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 3884-3889, 2000.

FEIT, A.; EL-SHERIF, N.; KOROSTOFF, S. Chagas' disease masquerading as coronary artery disease. *Arch. Intern. Med.*, v. 143, p. 144 –145, 1983.

FINCHAM, V.J.; UNLU, M.; BRUNTON, V.G.; PITTS, J.D.; WYKE, J.A.; FRAME, M.C. Translocation of Src kinase to the cell periphery is mediated by the actin cytoskeleton under the control of the Rho family of small G proteins. *J. Cell Biol.*, v. 135, p. 1551-1564, 1996.

FRAME, M.C.; BRUNTON, V.G. Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 12, p. 36-43, 2002.

FRANCO-PAREDES, C.; VON, A.; HIDRON A; RODRÍGUEZ-MORALES, A.J.; TELLEZ, I.; BARRÁGAN, M.; JONES, D.; NÁQUIRA, C.G.; MENDEZ, J. Chagas disease: an impediment in

achieving the Millennium Development Goals in Latin America. **BMC Int. Health Hum.**, v. 7, p. 1-6, 2007. doi: 10.1186/1472-698X-7-7.

FRANTZ, C.; STEWART, K.M.; WEAVER, V.M. The extracellularmatrix at a glance. **J. Cell Sci.**, v. 123, p. 4195-4200, 2010.

FREITAS, J.M.; ANDRADE, L.O.; PIRES, S.F.; LIMA, R.; CHIARI, E.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.; MACHADO, C.R.; FRANCO, G.R.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. **PLoS One**, v. 4, p. 1-4, 2009.

GRABHAM, P.W.; REZNIK, B.; GOLDBERG, D.J. Microtubule and Rac 1-dependent F-actin in growth cones. **J. Cell Sci.**, v. 116, p. 3739-3748, 2003.

GRINDLAY, J.H.; WAUGH, J.M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. **American Medical Association Archives of Surgery**, v. 63, p. 288-297, 1951.

GUEDES, P.M.; SILVA, G.K.; GUTIERREZ, F.R.; SILVA, J.S. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 9, p. 609-620, 2011.

HAGAR, J.M.; RAHINTOOLA, S.H. Chagas' heart disease in the United States. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 763-768, 1991.

HAŁOŃ, A.; DONIZY, P. The role of the ERM protein family in maintaining cellular polarity, adhesion and regulation of cell motility. **Postepy Hig. Med. Dosw.**, v. 66, p. 158-164, 2012.

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.**, v. 106, p. 521-527, 2012.

HERNÁNDEZ-OSORIO, L.A.; MÁRQUEZ-DUEÑAS, C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L.E.; BALLESTEROS-RODEA, G.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; MANNING-CELA, R.G. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 10, p.1-10, 2010.

HIGUCHI, M.L.; DE MORAIS, C.F.; PEREIRA BARRETO, A.C.; LOPES, E.A.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clin. Cardiol.**, v. 10, p. 665- 670, 1987.

HIGUCHI, M.D; RIES, M.M.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 56, p. 485-489, 1997.

HOTULAINEN, P.; PAUNOLA, E.; VARTIAINEN, M.K.; LAPPALAINEN, P. Actin depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. **Mol. Biol. Cell.**, v. 16, p. 649-664, 2005.

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.**, v. 72, p. 601-610, 1995.

HUDSON, L.; SNARY, D.; MORGAN, S.J. *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. **Parasitology**, v. 88, p. 283-294, 1984.

ITOH, T.; TANIOKA, M.; YOSHIDA, H.; YOSHIOKA, T.; NISHIMOTO, H.; ITOHARA, S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. **Cancer Res.**, v. 58, p. 1048-1051, 1998.

IVY, S.P.; WICK, J.Y.; KAUFMAN, B.M. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, v. 6, p. 569-579, 2009.

KENDALL, R.L.; WANG, G.; THOMAS, K.A. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 226, p. 324e328, 1996.

KNIAZEVA, E.; PUTNAM, A.J. Endothelial cell traction and ECM density influence both capillary morphogenesis and maintenance in 3-D. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 297, p. 179-187, 2009.

KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.*, v. 66, p. 188, 1975.

KUMAR, R. CXCL12/CXCR4 promotes motility and proliferation of glioma cells. *Ann. Neurosci.*, v. 17, p. 85-86, 2010.

KUMAR, R.V.; RAGHAVENDRA GOWDA, C.D.; SHIVAPRASAD, H.V.; SIDDESHA, J.M.; SHARATH, B.K.; VISHWANATH, B.S. Purification and characterization of “Trimarin” a hemorrhagic metalloprotease with factor Xa-like activity, from *Trimeresurus malabaricus* snake venom. *Thromb. Res.*, v. 126, p. 356-364, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LI, Q.; CHOW, A.B.; MATTINGLY, R.R. Three-dimensional overlay culture models of human breast cancer reveal a critical sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 332, p. 821-828, 2010.

LIANG, Z.; BROOKS, J.; WILLARD, M.; LIANG, K.; YOON, Y.; KANG, S.; SHIM H. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 359, p. 716-722, 2007.

LO, C.M.; WANG, H.B.; DEMBO, M.; WANG, Y.L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.*, v. 79, p. 144-152, 2000.

LÓPEZ, N.C.; VALCK, C.; RAMÍREZ, G.; RODRÍGUEZ, 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, e730. 2010. doi: 10.1371/journal.pntd.0000730.

MACHADO, F.C. **Galectina-3, AFAP1-L1 e WASP na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi* e caracterização biológica da proteína P21-His6.** Uberlândia: UFU, 2014. 67. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

MAJ, J.; JANKOWSKA-KONSUR, A.M.; HALÓŃ, A.; WOŹNIAK, Z.; PLOMER-NIEZGODA, E.; REICH, A. Expression of CXCR4 and CXCL12 and their correlations to the cell proliferation and angiogenesis in mycosis fungoides. *Postepy Dermatol. Alergol.*, v. 32, p. 437-442, 2015.

MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.C.; SIMOES, M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, v. 115, p. 1109-1123, 2007.

MARTINS, F.A. **Estudos biológicos da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*.** Uberlândia: UFU, 2013. 42. Monografia – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

MINEO, J. R. **Medidas de Biossegurança em laboratórios.** Uberlândia: Gráfica da Universidade Federal de Uberlândia (EDUFU), 2005, 55pp.

MORTARA, R.A.; ANDREOLI, W.K.; TANIWAKI, N.N.; FERNANDES, A.B.; SILVA, C.V.; FERNANDES, M.C.; L'ABBATE, C.; SILVA, Sd. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 77-94, 2005.

MORTARA, R.A.; ANDREOLI, W.K.; FERNANDES, M.C.; DA SILVA, C.V.; FERNANDES, A.B.; L'ABBATE, C.; DA SILVA, S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 47, p. 101-109, 2008.

MOUNEIMNE, G.; SOON, L.; DESMARAIS, V.; SIDANI, M.; SONG, X.; YIP, S.C.; GHOSH, M.; EDDY, R.; BACKER, J.M.; CONDEELIS, J. Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. **J. Cell Biol.**, v. 166, p. 697-708, 2004.

MURDOCH, C.E.; SHULER, M.; HAEUSSLER, D.J.; KIKUCHI, R.; BEARELLY P.; HAN, J.; WATANABE, Y.; FUSTER, J.J.; WALSH, K.; HO, Y.S.; BACHSCHMID, M.M.; COHEN, R.A.; MATSUI, R. Glutaredoxin-1 up-regulation induces soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, attenuating post-ischemia limb revascularization. **J. Biol. Chem.**, v. 289, p. 8633-8644, 2014.

MURTA, S.M.; GAZZINELLI, R.T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, p. 203-214, 1998.

OSER, M., CONDEELIS, J. The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. **J. Cell Biochem.**, v. 108, p. 1252-1262, 2009.

PAL, A., KLEER, C.G. Three dimensional cultures: a tool to study normal acinar architecture vs. malignant transformation of breast cells. **J. Vis. Exp.**, v. 86, 2014. doi:10.3791/51311.

PELHAM, R.J.JR.; WANG, Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 13661-13665, 1997.

PEREIRA, P.C.M.; NAVARRO, E.C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, p. 34, 2013.

PETIT, I.; JIN, D.; RAFII, S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. **Trends Immunol.**, v. 28, p. 299-307, 2007.

PEYTON, S.R.; GHAJAR, C.M.; KHATIWALA, C.B.; PUTNAM, A.J. The emergence of ECM mechanics and cytoskeletal tension as important regulators of cell function. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 47, p. 300-320, 2007.

PLUNKETT, M.L.; HAILEY, J.A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Lab. Invest.**, v. 62, p. 510-517, p. 1990.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 146, p. 873-887, 2011.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, p. 92-100, 2001.

RASSI, A.; RASSI Jr, A. Doença de Chagas. In: AMATO NETO, V.; GRYSCHEK, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. **Parasitologia: uma abordagem clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 127-138.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet.**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RATAJCZAK, M.Z.; ZUBA-SURMA, E.; KUCIA, M.; RECA, R.; WOJAKOWSKI, W.; RATAJCZAK, J. The plieotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. **Leukemia**, v. 20, p. 1915-1924, 2006.

ROBERTS, D.M.; KEARNEY, J.B.; JOHNSON, J.H.; ROSENBERG, M.P.; KUMAR, R.; BAUTCH, V.L. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. **Am. J. Pathol.**, v. 164, p. 1531-1535, 2004.

RODRIGUES, A. A.; CLEMENTE, T.M.; DOS SANTOS, M.A.; MACHADO, F.C.; GOMES, R.G.B.; MOREIRA, H.H.T.; CRUZ, M.C.; BRÍGIDO, P.C.; DOS SANTOS, P.C.F.; MARTINS, F.A.; BAHIA, D.; MARICATO, J.T.; JANINI, L.M.; REBOREDO, E.H.; MORTARA, R.A.; DA SILVA, C.V. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **PLoS ONE**, v. 7, e51384, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0051384.

RODRIGUES, C.M.; VALADARES, H.M.; FRANCISCO, A.F.; ARANTES, J.M.; CAMPOS, C.F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; ARAUJO, M.S.; ARANTES, R.M.; CHIARI, E.; FRANCO, G.R.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D.; FARIA, A.M.; MACEDO, A.M. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, e846, 2010.

SÁNCHEZ, L.V.; RAMÍREZ, J.D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology**, v. 140, p. 147-159, 2012.

SEDEH, R.S.; FEDOROV, A.A.; FEDOROV, E.V.; ONO, S.; MATSUMURA, F.; ALMO, S.C.; BATHE, M. Structure, evolutionary conservation, and conformational dynamics of *Homo sapiens* fascin-1, an F-actin crosslinking protein. **J. Mol. Biol.**, v. 400, p. 589-604, 2010.

SHEN, B.; ZHENG, M.Q.; LU, J.W.; JIANG, Q.; WANG, T.H.; HUANG, X.E. CXCL12-CXCR4 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. (2013). **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 14, p. 5403-5408, 2010.

SIDANI, M.; WESSELS, D.; MOUNEIMNE, G.; GHOSH, M.; GOSWAMI, S.; SARMIENTO, C.; WANG, W.; KUHL, S.; EL-SIBAI, M.; BACKER, J.M.; EDDY, R.; SOLL, D.; CONDEELIS, J. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. **J. Cell Biol.**, v. 179, p. 777-791, 2007.

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

SILVA, J.S.; ROSSI, M.A. Intensification of acute *Trypanosoma cruzi* myocarditis in BALB/c mice pretreated with low doses of cyclophosphamide or gamma irradiation. **J. Exp. Pathol.**, v. 71, p. 33-39, 1990.

SHIBUYA, M.; CLAESSEN-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Exp. Cell Res.**, v. 312, p. 549-560, 2006.

SNYDER, B.N.; CHO, Y.; QIAN, Y.; COAD, J.E.; FLYNN, D.C.; CUNNICK, J.M. AFAP1L1 is a novel adaptor protein of the AFAP family that interacts with cortactin and localizes to invadosomes. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 90, p. 376-89, 2011.

SOARES, M.B.; DE LIMA, R.S.; ROCHA, L.L.; VASCONCELOS, J.F.; ROGATTO, S.R.; DOS SANTOS, R.R.; IACOBAS, S.; GOLDENBERG, R.C.; IACOBAS, D.A.; TANOWITZ, H.B.; DE CARVALHO, A.C.; SPRAY, D.C. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 416-426, 2010.

STAMATAKOU, E.; HOYOS-FLIGHT, M.; SALINAS, P.C. Wnt Signalling Promotes Actin Dynamics during Axon Remodelling through the Actin-Binding Protein Eps8. **PLoS One**, v. 10, e0134976, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0134976.

SUN, C.X.; MAGALHÃES, M.A.; GLOGAUER, M. Rac1 and Rac2 differentially regulate actin free barbed end formation downstream of the fMLP receptor. **J. Cell Biol.**, v. 179, p. 239–245, 2007.

TAKEDA, Y.; UEMURA, S.; IWAMA, H.; IMAGAWA, K.; NISHIDA, T.; ONUYE, K.; TAKEMOTO, Y.; SOEDA, T.; OKAYAMA, S.; SOMEKAWA, S.; ISHIGAMI, K.; TAKAOKA, M.; KAWATA, H.; KUBO, A.; HORII, M.; NAKAJIMA, T.; SAITO, Y. Treatment with recombinant placental growth factor (PIGF) enhances both angiogenesis and arteriogenesis and improves survival after myocardial infarction. **Circ. J.**, v. 73, p. 1674-1682, 2009.

TEICHER, B.A.; FRICKER, S.P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 16, p. 2927-2931, 2010.

TEIXEIRA, A.R.; HECHT, M.M.; GUIMARO, M.C.; SOUSA, A.O.; NITZ, N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 592-630, 2011.

TEIXEIRA, T.L.; MACHADO, F.C.; ALVES DA SILVA, A.; TEIXEIRA, S.C.; BORGES, B.C.; DOS SANTOS, M.A.; MARTINS, F.A.; BRÍGIDO, P.C.; RODRIGUES, A.A.; NOTÁRIO, A.F.; FERREIRA, B.A.; SERVATO, J.P.; DECONTE, S.R.; LOPES, D.S.; ÁVILA, V.M.; ARAÚJO, F.D.E.; TOMIOSO, T.C.; SILVA, M.J.; DA SILVA, C.V. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 16877, 2015. doi: 10.1038/srep16877.

THOENES, L.; GUNTHER, M. Novel approaches in anti-angiogenic treatment targeting endothelial F-actin: a new anti-angiogenic strategy? **Curr. Opin. Mol. Ther.**, v. 10, p. 579-590, 2008.

TORRES, F.W.; ACQUATELLA, H.; CONDADO, J.A.; DINSMORE, R.; PALÁCIOS, I.F. Coronary vascular reactivity is abnormal in patients with Chagas' disease. **Am. Heart J.**, v. 129, p. 995–1001, 1995.

TSUKITA, S.; OISHI, K.; SATO, N.; SAGARA, J.; KAWAI, A.; TSUKITA, S. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. **J. Cell Biol.**, v. 126, p. 391-401, 1994.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas”. Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.3, p. 276-293, 1911.

VILLARREAL, D.; NIRDÉ, P.; HIDE, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2701-2709, 2009.

VU, T.H.; SHIPLEY, J.M.; BERGERS, G.; BERGER, J.E.; HELMS, J.A.; HANAHAN, D.; SHAPIRO, S.D.; SENIOR, R.M.; WERB, Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. **Cell**, v. 93, p. 411-422, 1998.

WALKER, D.M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; MCGWIRE, B.S.; DREW, M.E.; SATOSKAR, A.R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 4, p. 72–91, 2013.

WEED, S.A.; PARSONS, J.T. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. **Oncogene**, v. 20, p. 6418-6434, 2001.

WELTI, J.; LOGES, S.; DIMMELER, S.; CARMELIET, P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 123, p. 3190-3200, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **The World Health Report 2015: Reducing Risk, Promoting Healthy Life**. Geneva: World Health Organization, 2015.

WU, W.K.; GEORGIADIS, A.; COPLAND, D.A.; LIYANAGE, S.; LUHMANN, U.F.; ROBBIE, S.J.; LIU, J.; WU, J.; BAINBRIDGE, J.W.; BATES, D.O.; ALI, R.R.; NICHOLSON, L.B.; DICK, A.D. IL-4

regulates specific Arg-1(+) macrophage sFlt-1-mediated inhibition of angiogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 185, p. 2324-2335, 2015.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 28, p. 15–33, 2009.

ZHAO, L.P.; HUANG, L.; TIAN, X.; LIANG, F.Q.; WEI, J.C.; ZHANG, X.; LI, S.; AND ZHANG, Q.H. Knockdown of ezrin suppresses the migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells in vitro. **J. Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.**, v. 36, p. 243-248, 2016.

ZHOU, Z.; APTE, S.S.; SOININEN, R.; CAO, R.; BAAKLI, G.Y.; RAUSER, R.W.; WANG, J.; CAO, Y.; TRYGGVASON, K. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 4052-4057, 2000.