

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

**A forma recombinante da proteína 21 de *Trypanosoma cruzi* interage com o receptor CXCR4 e diminui a invasão e proliferação de células tumorais de mama humanas**

Bruna Cristina Borges

Uberlândia – MG  
Agosto/2019

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

**A forma recombinante da proteína 21 de *Trypanosoma cruzi* interage com o receptor CXCR4 e diminui a invasão e proliferação de células tumorais de mama humanas**

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

Bruna Cristina Borges  
Orientador: Marcelo José Barbosa Silva  
Co-orientador: Claudio Vieira da Silva

Uberlândia – MG  
Agosto/2019

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

---

B732f  
2019      Borges, Bruna Cristina, 1990  
A forma recombinante da proteína 21 de *Trypanosoma cruzi* interage com o receptor CXCR4 e diminui a invasão e proliferação de células tumorais de mama humanas [recurso eletrônico] / Bruna Cristina Borges. - 2019.

Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.

Coorientador: Claudio Vieira da Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1265>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Mamas - Câncer. 4. Receptores de quimiocinas. I. Silva, Marcelo José Barbosa, 1976, (Orient.). II. Silva, Claudio Vieira da, 1972, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

## **Agradecimentos**

“Um fio invisível conecta os que estão destinados a conhecer-se, independentemente do tempo, lugar ou circunstância. O fio pode esticar ou emaranhar-se, mas nunca irá partir” (Provérbio japônes).

Nesse momento passa um filme em minha cabeça. E o sentimento que me rege é a gratidão! Durante a minha vida de pós-graduanda, sempre encontrei pessoas dispostas a ajudar e também dispostas a me ensinar. Pessoas que serviram como um espelho para moldar a profissional e a pessoa que sou hoje.

Agradeço aos meus dois orientadores, Marcelo José Barbosa Silva e Claudio Vieira da Silva, por tanta paciência, por tantos ensinamentos, por cada palavra dita nestes anos. Sou extremamente grata ao Professor Claudio por ter me acolhido em seu laboratório, me incentivado na carreira de pesquisa e por todo o incentivo dado, até hoje. Quero que saiba que você é uma grande inspiração para mim e que todos os dias aprendo muito com você. Professor Marcelo, obrigada pela oportunidade de aprender tanto com você! Obrigada pelas conversas e conselhos. Saibam que cada palavra de estímulo e que todas as boas críticas estão guardadas e, que eu tento usá-las. Conviver com vocês é uma honra, profissionais excelentes e com visões completamente diferentes, por vezes, me deixavam confusa, mas acredito que só amadureci e cresci com esses dois pontos de vista. Me sinto realizada, feliz e sei que estou na carreira certa. Em um momento político e financeiro que nos causa tamanha tristeza, relembrar do incentivo e lembrar-me do porquê estou aqui, me dá forças para seguir e apenas pensar positivo.

Junto com dois orientadores, sempre tive dois laboratórios e duas galeras boas para conviver. Sou eternamente grata a todos os alunos que estão e aos que já passaram pelo LATRI, assim como pelos que estão e pelos que já passaram pelo LABIOT. Sem a ajuda de vocês, muitos experimentos não teriam acontecido, muitas trocas de ideias não teriam me feito crescer pessoal/profissionalmente. Se não fosse por vocês, esses quatro anos e meio não seriam os mesmos.

Fugindo do ambiente laboratorial, mas nem tanto, agradeço ao Rodrigo, que por diversas vezes esteve no laboratório comigo aos fins de semana. Muito obrigada por todo o apoio, pela compreensão e por acreditar no meu sonho junto comigo! Agradeço a toda à minha família pelo apoio incondicional e por acreditarem tanto em mim. Agradeço aos meus pais, Norma e Geraldo, meu irmão e minha cunhada, Deivid e Lílían e de forma muito especial, agradeço a Olívia e ao Augusto que está chegando. Vocês são a minha base, a razão em querer ser melhor todos os dias, em buscar um futuro melhor para nós. Muito obrigada pelo apoio de vocês. Vocês são essenciais em cada pequena vitória minha!

Agradeço ao Programa de Imunologia e Parasitologia Aplicadas, aos ótimos e queridos professores que compõe esse programa, às secretárias, “Lus”, pela paciência e dedicação. Agradeço a todos os técnicos que me ajudaram de várias maneiras!

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia por todo o conhecimento e experiência que aqui adquiri. Aos órgãos FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro dado durante a minha pós-graduação. Torço e oro muito para que todas as universidades federais, os programas de pós-graduação e as agências de fomento resistam a esse momento político!

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

**“Quanto mais me aprofundo na ciência,  
mais me aproximo de Deus.”  
(Albert Einstein)**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem  
°C - Graus Celsius  
µg - Microgramas  
µL - Microlitros  
ng - Nanogramas  
ATCC - American Type Culture Collection  
CD - *Cluster of differentiation*  
CXCL12 - C-X-C motivo ligante 12  
CXCR4 - C-X-C receptor de quimiocina tipo 4  
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*  
EGF - Fator de Crescimento Epidermal  
HIF-1 $\alpha$  - Fator induzível por hipóxia - 1 $\alpha$   
Akt - Proteína Kinase B  
CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
IPTG - *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*  
GRK - Receptor de quinase acoplado a proteína G  
GP82 – Glicoproteína de superfície de 82 kDa  
kDa - Quilo Dalton  
L - Litros  
LB - Meio Luria-Bertani  
MAPKs - Proteínas quinases ativadas por mitógenos  
mL - Mililitros  
M - Molar  
mM - Milimolar  
mm<sup>2</sup> - Milímetros quadrados  
MPO - Mieloperoxidase  
NF- $\kappa$ B - Fator nuclear kappa B  
nm - Nanômetro  
OD - Densidade Óptica (absorbância)  
PI3K/AKT - Fosfatidilinositol-3-quinase/ Proteína quinase B  
PLC - Fosfolipase C

U - Unidades

SDS - Dimetilsulfóxido

SDF-1 $\alpha$  - Fator derivado de células estromais - 1 $\alpha$

SFB - Soro fetal bovino

shRNA - *short harpain* RNA

PBS - Solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2

pH - Potencial hidrogênionico

rpm - Rotações por minuto

RPMI - Meio *Roswell Park Memorial Institute*

SFB - Soro Fetal Bovino

sFlt-1 - fms-like tyrosine kinase receptor-1

VEFGA – Fator de crescimento endotelial vascular A

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Obtenção da forma recombinante da P21.....	23
<b>Figura 2:</b> rP21 não apresentou toxicidade às linhagens celulares.....	28
<b>Figura 3:</b> MDA-MB-231 possui maior quantidade do receptor CXCR4 do que as células MCF-10A.....	30
<b>Figura 4:</b> rP21 é capaz de ligar-se às células MCF-10A e MDA-MB-231.....	32
<b>Figura 5:</b> rP21 diminui os níveis do receptor CXCR4 na membrana das células MCF-10A e MDA-MB-231, mas é internalizada e co-localizada com o CXCR4 apenas das células MDA-MB-231.....	37
<b>Figura 6:</b> rP21 reduz a migração horizontal das células MDA-MB-231.....	38
<b>Figura 7:</b> rP21 promove redução na invasão das células MDA-MB-231.....	42
<b>Figura 8:</b> rP21 interrompe a progressão do ciclo celular da MDA-MB-231.....	45



## Sumário

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	5
LISTA DE FIGURAS .....	7
Resumo .....	10
Abstract.....	11
1. Introdução .....	12
1.1. Câncer .....	12
1.2. Receptor CXCR4 .....	12
1.3. Microrganismos e câncer .....	15
1.4. <i>Trypanosoma cruzi</i> e carcinogênese .....	16
1.5. Proteína recombinante 21 (rP21) de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo geral .....	20
2.2. Objetivos específicos .....	20
3. Material e métodos .....	21
3.1. Local do estudo .....	21
3.2. Normas de biossegurança .....	21
3.3. Cultura celular.....	21
3.4. Purificação e renovelamento da proteína recombinante P21 (colocar resumido).....	22
3.5. Viabilidade Celular .....	23
3.6. Presença do receptor CXCR4 nas linhagens celulares (dividir citometria e confocal) .	24
3.7. Ensaio de ligação da proteína rP21 às células de mama.....	25
3.8. Níveis do receptor CXCR4 após o tratamento com a rP21 .....	25
3.10. Migração horizontal celular .....	26
3.11. Invasão/migração celular .....	26
3.12. Ciclo celular .....	27
3.13. Análise Estatística.....	28
4. Resultados e Discussão.....	29
4.1. rP21 não é citotóxica para as células tumorais ou para as células normais de mama....	29
4.2. A proteína recombinante P21 é capaz de ligar-se às células tumorais de mama e às células normais pelo receptor CXCR4.....	30
4.3. A migração e invasão celular são reduzidas após o tratamento com a rP21.....	38

4.4. rP21 atua no ciclo celular das células tumorais aumentando a fase G1.....	44
5. Conclusão .....	48
6. Perspectivas futuras .....	48
7. Referências bibliográficas .....	49
8. Produção científica durante o doutorado .....	57

## Resumo

Vários estudos têm demonstrado a ação de diversos tipos de microrganismos e de componentes isolados desses, na redução de tumores em modelos animais, bem como em cultura de células, sendo o *Trypanosoma cruzi* um desses microrganismos. A forma recombinante da proteína 21 (rP21) de *T. cruzi* desempenha diferentes atividades biológicas, além de estar diretamente envolvida na invasão celular do protozoário. Dentre essas atividades foi observado que esta proteína se liga ao receptor de quimiocinas CXCR4 em macrófagos, apresenta atividade quimiotática para células do sistema imunológico, inibe a angiogênese e modula negativamente a replicação do parasito. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a ação do tratamento com a proteína recombinante 21 de *Trypanosoma cruzi* em células não tumorais de mama (MCF-10A) e em células tumorais triplo-negativas metastáticas (MDA-MB-231). Inicialmente realizamos o ensaio de citotoxicidade e foi visto que o tratamento com a rP21 em diferentes concentrações nas células pelo tempo de 72 horas, não foi capaz de causar morte em nenhuma das linhagens celulares estudadas. Após o teste de citotoxicidade, verificamos a expressão do receptor CXCR4 nessas linhagens celulares, a capacidade da rP21 em ligar-se às mesmas células e se essa ligação era mediada pelo receptor CXCR4. Assim, demonstrou-se que a linhagem tumoral metastática expressa muito mais o receptor quando comparada a linhagem normal. E, apesar da diferença de expressão do receptor, a rP21 liga-se em ambas as linhagens celulares, porém só é internalizada nas células metastáticas. Após o tratamento das células com a rP21, notou-se a diminuição na migração, invasão e o bloqueio do ciclo celular, principalmente, das células tumorais metastáticas. Dessa forma, os dados mostram que a ligação da rP21 às células é feita pelo receptor CXCR4, tanto das células normais quanto das células tumorais de mama, e que essa ligação causa a internalização da proteína recombinante e, possivelmente, a dessensibilização do receptor apenas na linhagem MDA-MB-231, o que impossibilita a migração, invasão e a progressão do ciclo celular dessas células.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, proteína recombinante 21, CXCR4, invasão celular, células tumorais metastáticas de mama.

## Abstract

Several studies have demonstrated the action of various types of microorganisms and individual components in reduction of tumors in animal models, as well as cultured cells, *Trypanosoma cruzi* is one of these microorganisms. Parasite's protein 21 plays a different biological role directly involved in cell invasion. The recombinant P21 (rP21) binds to macrophages CXCR4 chemokine receptor and has chemotactic activity in immune cells, inhibits angiogenesis and downregulate parasite replication. The aim of this study was verify rP21 effect on non-tumor cells (MCF-10A) and metastatic tumor cells (MDA-MB-231) CXCR4 receptor. Initially, cytotoxicity assay was performed with different concentrations of rP21 in 72 hours of treatment, protein was not cytotoxic in both cells. After cytotoxicity assay, expression of CXCR4 in cell lines, ability of rP21 binds to cells and if this binding was mediated by CXCR4, were investigated. Tumor cells expressed more receptor when compared to health cells, although the expression is different between them: rP21 binds to both cells in a short period of treatment, but is only internalized in MDA-MB-231 cells. After cells treatment, rP21 acts decreasing migration, invasion and blocking cell cycle, especially of metastatic tumor cells. In one hand, rP21 binding is made by CXCR4 receptor in health and breast cancer cells. On the other hand, internalization of recombinant protein and receptor desensitization only in MDA-MB-231. In conclusion, rP21 prevents migration, invasion and progression of the cell cycle in breast cancer cells.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Recombinant P21, CXCR4, invasion cell, metastatic breast cancer cells.

## 1. Introdução

### 1.1. Câncer

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação desordenada e aumentada de células com alguma falha no controle de mitose (SELL, 1993). Alguns tipos de cânceres são a 6ª causa de morte no mundo, como o câncer de pulmão (OPAS, 2018), mas entre as mulheres, o principal câncer diagnosticado e com maior taxa de mortalidade, é o câncer de mama (BRAY *et al.*, 2018).

O câncer de mama pode ser caracterizado molecularmente e dividido em: câncer de mama Luminal A, Luminal B, HER2 e triplo negativo, sendo que essa divisão relaciona-se diretamente com o tratamento do tumor e, consequentemente, com o prognóstico do paciente (SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009; RAKHA; ELLIS, 2011). O câncer de mama Luminal A possui receptor de estrógeno ou receptor de progesterona, é HER2 (receptor de fator de crescimento epidermal humano 2) negativo e possui marcador de proliferação celular (Ki67) menor ou igual a 14%. O câncer de mama Luminal B possui receptor de estrógeno ou receptor de progesterona, é HER2 negativo e possui marcador de proliferação celular (Ki67) maior que 14%. O câncer de mama HER2 possui superexpressão de HER2 e pode ter ou não a presença dos receptores hormonais, sendo assim a presença dos receptores hormonais ou do receptor HER2 tornam-se moléculas-alvo para o tratamento do tumor (SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009; RAKHA; ELLIS, 2011).

O câncer de mama triplo negativo é constituído por células que não possuem receptor de estrógeno, receptor de progesterona e o HER-2 sendo associado a um mau prognóstico (BONOTTO *et al.*, 2014; DEN BROK *et al.*, 2017). Essa associação se deve por dois fatores: pelas características clinicopatológicas malignas desse tipo de tumor, que propiciam a ocorrência de metástases e pela ineficiência de terapias endócrinas, como o uso do transtuzumab, devido a ausência dos receptores-alvo (VENKITARAMAN, 2010; VODUC *et al.*, 2019). Assim, novas moléculas alvo são pesquisadas, dentre elas está o receptor CXCR4 (CHEN *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2018)

### 1.2. Receptor CXCR4

O receptor CXCR4 (CD184) é um receptor de quimiocinas da família dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) contendo sete domínios transmembrana (COJOC; PEITZSCH, 2013). CXCR4 está localizado em células hematopoiéticas, incluindo neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, células dendríticas, células progenitoras CD34<sup>+</sup>, células

endoteliais e células do sistema nervoso central e periférico (ROSSI; ZLOTNIK, 2000). Esses receptor possui como principal ligante a quimiocina CXCL12.

CXCL12 é uma pequena quimiocina pleiotrópica (8 kDa) expressa em células estromais de diferentes órgãos, como pulmão, osso, linfonodos, cólon, cérebro, coração, rim e fígado, no qual atua como quimioatraente para células hematopoiéticas maduras e imaturas, sendo assim essa quimiocina torna-se importante para o desenvolvimento da inflamação e para a vigilância imunológica dos tecidos (KUCIA *et al.*, 2004; PERNAS *et al.*, 2018). CXCL12 pode ser expressa em duas isoformas principais: SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 $\alpha$ , a isoforma predominante, e SDF-1 $\beta$ /CXCL12 $\beta$ . Além delas, mais quatro isoformas podem ser encontradas advindas do *splicing* alternativo do gene, sendo que a porção C-terminal dessas diferentes isoformas podem contribuir para as diferentes atividades biológicas dessa quimiocina (ALTENBURG *et al.*, 2007; KUCIA *et al.*, 2004; LIEKENS; SCHOLS; HATSE, 2010).

A ligação entre CXCL12 e CXCR4 culmina com a ativação da proteína G heterotrimérica, que inicia a sinalização mediada por G $\alpha$  ou G $\beta\gamma$  (LIEKENS; SCHOLS; HATSE, 2010). Ambas subunidades regulam várias vias que estão envolvidas com alteração de citoesqueleto, migração e sobrevivência das células (COJOC; PEITZSCH, 2013; LIEKENS *et al.*, 2010). Além dessas funções, tal eixo também é extremamente importante para a organogênese. Foi visto que animais *knockouts* para CXCL12/CXCR4 possuem defeitos no desenvolvimento de órgãos, como coração, cérebro e vasos sanguíneos. Assim, para que a formação dos órgãos ocorra de maneira adequada, as células progenitoras de vários tecidos e órgãos precisam expressar o receptor CXCR4 funcionalmente na membrana celular (KUCIA *et al.*, 2004). O fato de que as células progenitoras precisam possuir o receptor CXCR4 para o desenvolvimento adequado dos órgãos, pode explicar também, por que muitas células tumorais originadas de células bem diferenciadas possuem na membrana plasmática o receptor CXCR4 (KUCIA *et al.*, 2004).

O receptor CXCR4 é o receptor mais expresso em células tumorais por ter sido detectado em células de diversos tipos de cânceres, como: leucemia linfóide crônica de células B, leucemia mielogênica aguda, linfoma não Hodgking, mieloma múltiplo, câncer de tireoide, câncer renal, câncer de mama e outros (BACHELDER; WENDT; MERCURIO, 2002; HWANG *et al.*, 2003; MO, C., 2003; MÖHLE *et al.*, 1999; MÖHLE *et al.*, 2000; SCHRADER *et al.*, 2002; WENG; SHAHSAFAEI; DORFMAN, 2003). As células tumorais, além de apresentarem altos níveis desse receptor, têm a capacidade de produzir CXCL12 que age de maneira autócrina e parácrina, estimulando o crescimento do tumor, bem como a metástase das células tumorais (LIEKENS; SCHOLS; HATSE, 2010).

Em condições de hipóxia no ambiente intratumoral, HIF-1 $\alpha$  começa a ser regulado positivamente e aumenta a expressão de CXCR4 nas células tumorais (SCHIOPPA *et al.*, 2003). As células CXCR4<sup>+</sup> são direcionadas pelo gradiente de concentração de CXCL12, a saírem do tumor em direção aos órgãos que expressam mais CXCL12 causando assim as metástases (TEICHER; FRICKER, 2010). Além da quimiotaxia, a ligação do CXCL12 local com o CXCR4 da célula que migrou, estimula inúmeras cascatas de sinalização que culminam com a proliferação, sobrevivência e interfere na transcrição de genes (LOMBARDI *et al.*, 2013)

A superexpressão do receptor CXCR4 em células tumorais de mama e de adenocarcinoma pancreático correlaciona-se diretamente com o prognóstico da doença, sendo relacionado diretamente ao tempo de sobrevida do paciente e à variáveis clínicopatológicas do tumor, como envolvimento dos linfonodos (PEHLIVAN *et al.*, 2018; KRIEG *et al.*, 2015). Uma associação entre a presença de CXCR4 e a metástase tumoral é encontrada em carcinoma renal, câncer colorretal, câncer de esôfago, adenocarcinoma de pâncreas e câncer de mama, com isso a presença de CXCR4 acaba sendo um indicador de um mau prognóstico da doença (PEHLIVAN *et al.*, 2018; KRIEG *et al.*, 2015; LV *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2014).

Como forma de evitar a interação CXCL12/CXCR4 e, consequentemente, diminuir a angiogênese, proliferação, sobrevivência e quimiotaxia de células tumorais, tem sido utilizados ligantes peptídicos ou não-peptídicos como antagonistas da atividade CXCL12/CXCR4, sendo o principal deles, o composto metálico AMD3100 ou Plerixafor (WALENKAMP *et al.* 2017). O antagonista AMD3100 foi desenvolvido, inicialmente, visando uma terapia anti-HIV, porém foi observado que ele é capaz de reduzir a sobrevivência e metástase de células de osteosarcoma, além de inibir a proliferação, invasão e metástase dessas células (JIANG *et al.*, 2017; LIAO *et al.*, 2015). AMD3100 também é utilizado no tratamento de leucemias e tumores sólidos, sensibilizando as células tumorais aos efeitos tóxicos da quimioterapia (LIU *et al.*, 2016). Embora tenham inúmeras vantagens, o uso dos antagonistas de CXCR4 podem aumentar os riscos de doenças hematológicas quando usados sozinhos ou em combinação com a quimioterapia, assim uma avaliação da ação geral do antagonista é necessária (PERNAS *et al.*, 2018). Com todas essas informações, CXCR4, no contexto de tumores, torna-se um alvo terapêutico, principalmente, para o câncer de mama triplo negativo (ZHOU *et al.*, 2018) .

As terapias convencionais para o câncer como quimioterapia, radioterapia e cirurgia aumentam a sobrevida do paciente, mas podem gerar inúmeros efeitos colaterais (ALI; HO; KUH, 2015). Assim a imunoterapia têm ganhado espaço como uma opção promissora ao tratamento do câncer, pois estimula as células do sistema imune a responder contra os antígenos

tumorais. No entanto, esse estímulo pode acarretar o desenvolvimento de respostas autoimunes, o que pode limitar o seu uso (WOLCHOK *et al.*, 2017).

### 1.3. Microrganismos e câncer

Inúmeros estudos correlacionam a presença de microrganismos com o surgimento do câncer (VELÁZQUEZ; PEIX; GÓMEZ-ALONSO, 2011), porém alguns outros estudos relatam efeitos antitumorais de diversos tipos de microrganismos, tanto comensais quanto patogênicos (DZUTSEV *et al.*, 2017; GHARAIBEH AND JOBIN, 2019; ŁUKASIEWICZ; FOL, 2018). Assim, o estudo dos microrganismos, com base em suas propriedades físicas, liberação de toxinas e proteínas, bem como utilizando-os como vetores têm sido amplamente realizado (ŁUKASIEWICZ; FOL, 2018). A partir de técnicas da engenharia genética, a utilização de bactérias e vírus para o tratamento de tumores já vêm tornando-se efetiva (KLOKER *et al.*, 2019; TORRES *et al.*, 2018). Estudos envolvendo helmintos e protozoários também demonstram um grande potencial desses patógenos e de proteínas secretadas por eles na regressão ou inibição do desenvolvimentos de tumores (ŁUKASIEWICZ; FOL, 2018).

Um estudo realizado para relacionar a infecção por *Strongyloides stercoralis* e o desenvolvimento de leucemia de células T em adultos mostrou que a sobrevivência desses pacientes foi maior do que os pacientes que não tinham a infecção (PLUMELLE *et al.*, 1997). O *Echinococcus granulosus* possui semelhanças entre seus peptídeos e peptídeos de células tumorais, assim anticorpos produzidos contra *E. granulosus* podem reconhecer células de tumor de mama e cólon (NOYA *et al.*, 2013). *Trichinella spiralis* está associada com a redução de melanomas e de metástases por diminuir citocinas como: CXCL9, CXCL10 e CXCL13 (KANG *et al.*, 2013).

Modelos animais com desenvolvimento espontâneo de tumores mamários e leucemia tiveram os tumores suprimidos após injeção do antígeno de *Toxoplasma gondii* ou dos parasitas viáveis (HIBBS *et al.*, 1971; MIYAHARA *et al.*, 1992). Também foi visto que camundongos infectados com *T. gondii* tiveram a diminuição do crescimento do carcinoma pulmonar de Lewis, associado a atividade anti-angiogênica (KIM *et al.*, 2007). Ainda relacionado ao carcinoma pulmonar de Lewis, foi visto que animais com infecção por *Plasmodium* tiveram a inibição do crescimento das células tumorais e de metástases, assim como tiveram sua sobrevivência aumentada (CHEN *et al.*, 2011). Achados na literatura, apontam o aumento da temperatura corporal, como um tratamento plausível para certos tipos de neoplasia, isso explicaria a relação da hipertermia causada por *Plasmodium* em exercer ação antitumoral (CHEN *et al.*, 2011).



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

#### **1.4. *Trypanosoma cruzi* e carcinogênese**

A hipótese de antagonismo entre a doença de Chagas ocasionada por *Trypanosoma cruzi* e a progressão tumoral não é recente (ROSKIN; EXEMPLARSKAJA, 1931). Já na década de 30, pesquisadores observaram que o *T. cruzi* possui tropismo pelas células tumorais (ROSKIN; EXEMPLARSKAJA, 1931). Posteriormente, alguns autores propuseram que ação antitumoral estaria ligada a competição por nutrientes entre o tumor e o a parasita (HAUSCHKA; GOODWIN, 1948), sendo que essa teoria foi contrariada, pois sabe-se que o desenvolvimento tumoral envolve um processo muito complexo de angiogênese e aumento da disponibilidade de substratos (FOLKMAN, 2003).

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

Têm sido publicado, estudos relacionando a influência da parasitemia de *T. cruzi* e a resposta imune protetiva formada contra o patógeno, que reage de forma cruzada contra as células tumorais e o emprego de proteínas produzidas pelo protozoário com ação antitumoral (KALLIKINOVA *et al.*, 2006; CABRAL, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001; SHEKLAKOVA *et al.*, 2003; LOPEZ *et al.*, 2010; RAMIREZ *et al.*, 2012; ZHIGUNOVA *et al.*, 2013). Estudos *in vivo* utilizando ratos infectados sem tumor ou com tumor verificou que no primeiro grupo os órgãos mais acometidos pelo parasita na fase crônica eram: coração, fígado e rim, já no grupo com o tumor essa distribuição era: coração, tumor e fígado. Demonstrando, assim, uma modificação no padrão da invasão tecidual devido à presença do sarcoma-180, comprovando,

assim, o tropismo de *T. cruzi* para células tumorais (KALLIKINOVA *et al.*, 2006). Em um outro estudo foi visto que a infecção crônica por *T. cruzi* diminui a incidência de câncer de colón em ratos tratados com dimetilhidrazina. Os autores discutem que o provável mecanismo envolvido nesse fenótipo seria o comprometimento das fibras nervosas do colón causado pelo parasita (OLIVEIRA *et al.*, 2001). O tratamento de células tumorais de mama com o lisado da forma epimastigota de *T. cruzi* promoveu a inibição do crescimento das células tumorais e esse efeito estaria relacionado com as características genéticas e a cepa do parasita (SHEKLAKOVA *et al.*, 2003; BATMONKH *et al.*, 2006; ATAYDE *et al.*, 2008). Outro estudo *in vivo* mostrou que camundongos infectados com *T. cruzi* e, posteriormente, desafiados com células do sarcoma 180 e com células de Ehrlich, apresentaram redução do tumor (KALLINIKOVA *et al.*, 2006).

O mimetismo molecular entre o parasita e as células tumorais também garante que haja uma resposta cruzada do sistema imune frente a esses antígenos compartilhados, sendo que anticorpos produzidos contra o parasita conseguem reconhecer células tumorais e gerar uma resposta contra elas (UBILLOS *et al.*, 2016). Para comprovar, camundongos foram imunizados com antígenos derivados da forma epimastigota de *T. cruzi*. Os esplenócitos foram isolados e transplantados em camundongos com adenocarcinoma de Ehrlich e, surpreendentemente, esse tumor não desenvolveu nesses animais, indicando que a resposta celular direcionada contra o *T. cruzi* é também direcionada para o tumor de Ehrlich. Com isso, demonstrou-se que antígenos de *T. cruzi* e das células do tumor de Ehrlich, possuem epítomos em comum já demonstrados como sendo as mucinas, principalmente, do tipo O-glicosiladas (OSINAGA, 2007; ZENINA *et al.*, 2008; ZHIGUNOVA *et al.*, 2013). Para comprovar também a resposta imune cruzada entre *T. cruzi* e células tumorais, ratos foram imunizados com lisado de epimastigotas, o soro dos animais foi isolado e foi visto que os anticorpos produzidos contra *T. cruzi* reconhecem células tumorais de mama e cólon humanos. Além disso, foi demonstrado que a imunização com o lisado de *T. cruzi* inibe o desenvolvimento de câncer de mama e cólon quimicamente induzidos (UBILLOS *et al.*, 2016).

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

Estudos mostraram que duas proteínas presentes no *T. cruzi* apresentam atividade antitumoral. A forma recombinante da proteína GP82, específica da forma tripomastigota metacíclica de *T. cruzi* é capaz de induzir apoptose de células de melanoma *in vitro* e reduzir

tumor *in vivo*, pois ela está relacionada à indução de exposição de fosfatidilserina, alteração na morfologia celular, fragmentação do DNA, aumento na despolarização mitocondrial com aumento na atividade de caspase-3 e retenção citoplasmática do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (ATAYDE *et al.*, 2008). NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que participa na resposta inflamatória, sendo que no citoplasma ele está no seu estado inativo e, quando fosforilado, transloca-se para o núcleo e promove a transcrição de genes. Em alguns tipos de câncer, estímulos induzem a fosforilação de NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, sua translocação para o núcleo, iniciando a indução da produção de oncogenes (KARIN, 2009). Também foi demonstrado que a chaperona molecular calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) é capaz de translocar para a membrana plasmática do parasita e inibir as cascatas de ativação do sistema complemento favorecendo a infecção. Além disso, a calreticulina possui um fragmento na porção n-terminal, denominada vasostatina, que é capaz de impedir a ligação das células endoteliais à matriz extracelular. Essa característica garante a calreticulina uma atividade antiangiogênica e, por isso, ela é capaz de apresentar propriedades antitumorais *in vivo* (LOPEZ *et al.*, 2010, RAMIREZ *et al.*, 2012).

Outra proteína recombinante de *T. cruzi*, a proteína 21, descoberta em 2009 (SILVA *et al.*, 2009) têm apresentado um grande potencial biológico em relação ao microambiente tumoral, uma vez que essa proteína possui ação antiangiogênica, similar a proteína calreticulina (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

### **1.5. Proteína recombinante 21 (rP21) de *Trypanosoma cruzi***

Uma proteína de *T. cruzi* foi descoberta e denominada proteína 21, essa molécula é secretada por todas as formas evolutivas do parasito e está envolvida na invasão celular pelas formas amastigotas e tripomastigotas. Sua forma recombinante (rP21) adere às células de mamífero de maneira dose-dependente, além de regular positivamente a invasão dos parasitos em células não fagocíticas (SILVA *et al.*, 2009). Além disso, a forma recombinante da P21 aumenta a capacidade fagocítica dos macrófagos por meio de um mecanismo dependente da ligação da proteína ao CXCR4, um receptor de quimiocinas, induzindo a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira e sinalização via PI3K (RODRIGUES *et al.*, 2012). A via de sinalização PI3K é capaz de ativar a via Akt a qual pode interagir com proteínas responsáveis pela proliferação celular, como NF- $\kappa$ B e com reguladores da apoptose, os quais são eventos importantes durante processos de inflamação, angiogênese e reparo tecidual (KARAR; MAITY, 2011). Devido à sua capacidade pró-fagocítica, a rP21 pode ser considerada um importante fator do *T. cruzi* para evadir a resposta imune do hospedeiro, garantindo a

permanência do parasito na célula hospedeira podendo participar de alguma forma no processo de cronificação da doença de Chagas (RODRIGUES *et al.*, 2012).

No modelo de angiogênese induzido em esponjas implantadas no dorso de camundongos, 40 µg/mL de rP21 foram injetadas a cada 72 horas durante nove dias. Nessa concentração, a rP21 reduziu a quantidade de hemoglobina nas esponjas, bem como a quantidade de vasos sanguíneos nessa região (TEIXEIRA *et al.*, 2015). Acredita-se que a inibição da formação de vasos ocorreu pois a rP21 aumentou a produção de sFlt-1 e reduziu a produção de VEGFA (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Além da atividade antiangiogênica, verificou-se que a rP21 estimula a quimiotaxia de leucócitos, principalmente, de macrófagos, os quais são responsáveis por secretar o fator sFlt-1 (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

A importância da P21 na biologia do parasita está sendo gradativamente elucidada. Além de um importante papel no desenvolvimento da doença de Chagas, a proteína recombinante rP21 possui importantes atividades biológicas como, indução da polimerização do citoesqueleto de actina, o recrutamento de células do sistema imunológico e atividade antiangiogênica, os quais nos instigam a explorar seu potencial terapêutico em processos tumorais.

De acordo com a literatura, sabemos que diversos microrganismos possuem ação antitumoral e que o *T. cruzi* tem essa ação relatada por vários mecanismos, incluindo a produção de proteínas como GP82 e calreticulina. Sendo que a rP21 liga-se ao receptor CXCR4 em macrófagos e que esse receptor é muito importante na evolução do câncer de mama triplo negativo, levantou-se a seguinte pergunta: a proteína recombinante 21 de *T. cruzi* liga-se ao receptor CXCR4 de células tumorais de mama triplo-negativas? Se essa ligação ocorre, quais são as possíveis ações mediadas pela ligação da rP21?

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a ação do tratamento com a proteína recombinante 21 de *Trypanosoma cruzi* em células não tumorais de mama (MCF-10A) e em células tumorais triplo-negativas metastáticas (MDA-MB-231).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a atividade citotóxica da rP21 em ambas as linhagens celulares.
- Verificar a presença do receptor CXCR4 nas células.
- Identificar a ligação da proteína rP21 nessas células e analisar se ocorre pelo receptor CXCR4.
- Verificar a influência da rP21 na migração e na invasão das células normais e das células tumorais de mama.
- Analisar a influência da proteína rP21 no ciclo celular de ambas as linhagens celulares.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Local do estudo**

Os ensaios deste estudo foram realizados no Laboratório de Biomarcadores tumorais e Osteoimunologia e no Laboratório de Tripanosomatídeos, ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

#### **3.2. Normas de biossegurança**

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

#### **3.3. Cultura celular**

Foram utilizadas duas linhagens de células para o desenvolvimento desse trabalho, MCF-10A e MDA-MB-231.

A linhagem MCF-10A (ATCC® CRL- 10317™), linhagem epitelial não transformada de mama humana, mantida em meio Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com hidrocortisona (0,5 µg/ml), EGF (20 ng/mL), insulina bovina (10 µg/mL) e toxina colérica (100 ng/mL), 5% de SFB, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina.

A linhagem MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), linhagem tumoral metastática triplo negativa de mama humana, mantida em meio RPMI 1640 (GIBCO, Paisley, UK) suplementado com 10% de SFB, 2 mM bicarbonato de sódio, 10 mM Hepes, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina.

O tampão PBS é composto de: NaCl (76 g), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,75 g) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (11,32 g) para uma solução concentrada em 10x. Para todos os ensaios foi utilizado o tampão diluído em 1x. O reagente PGN consiste em uma solução de PBS 1x com 0,125% de gelatina e 0,1% de azida, sendo que o PGN pode estar na presença de 0,1% de saponina (PGN saponina)

Todas as células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para a contagem das células utilizou-se câmara de Neubauer e a viabilidade dessas células foi determinada por exclusão pelo Azul de Trypan (Sigma Life Science), previamente a todos os experimentos.

### 3.4. Purificação e renovelamento da proteína recombinante P21 (colocar resumido)

O protocolo de purificação e renovelamento da rP21 utilizado foi o mesmo descrito por Silva e colaboradores (SILVA, et al., 2009, DOS SANTOS et al., 2014). O vetor pET-28a (+) contendo o gene completo para a forma nativa da proteína P21 de *T. cruzi* foi transfectado em *Escheria coli* BL21. Para o pré-inóculo, 200 µL das bactérias BL21 foram inoculadas em 10 mL de meio LB estéril, contendo o antibiótico Kanamicina (50 µg/mL), e o frasco foi mantido sob agitação *overnight* a 37°C. No dia seguinte, o pré-inóculo foi colocado em um frasco contendo 500 mL de meio LB estéril com o antibiótico Kanamicina. O frasco foi mantido sob agitação contínua a uma temperatura de 37°C até atingir a OD de aproximadamente 0,5 à 0,9, a qual foi medida em espectrofotômetro (Espectrofotômetro digital UV-2000a, Instrutherm). Para estimular a produção da proteína recombinante acrescentamos IPTG na concentração final de 1mM, manteve-se o frasco sob agitação contínua por três horas. O volume total foi centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento formado foi dissolvido em solução de ureia dissolvida em água destilada a 6M.

Em seguida, para induzir a lise celular utilizou-se a Lisozima (50 mg/mL), na proporção de 1 µL:1 mL por 20 minutos em gelo, após esse período o extrato bacteriano foi sonificado usando o Sonicador Branson Sonifier 450 (Marshall Scientific, EUA), durante vinte ciclos de 1 minuto com 30 segundos de intervalo entre os ciclos. O lisado foi submetido a cromatografia de afinidade usando coluna de Níquel. Utilizou-se 3 mL de coluna, a qual foi lavada com água destilada e tampão de ligação por três vezes usando centrifugação a 2000 rpm por 1 minuto, desprezando-se o sobrenadante para remover os tampões indesejados e equilibrando a coluna com o tampão de ligação sem ureia (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e água). Em seguida, o lisado bacteriano foi incubado com a coluna de níquel equilibrada e mantido sob agitação por 3 horas a 4°C. Após isso, a solução foi centrifugada a 2000 rpm por 1 minuto, ocorrendo a sedimentação das *beads* da coluna de Níquel com a proteína rP21 desenhovelada ligada às *beads* pela cauda de histidina. A coluna foi lavada três vezes com o tampão de ligação (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M), três vezes com o tampão de lavagem (imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20mM pH 8,0, ureia 6M), sendo centrifugada a 2000 rpm por 1 minuto a 4°C e o sobrenadante desprezado. Em seguida, foi feita a lavagem da coluna com o tampão de eluição (imidazol 1M, NaCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M) quatro vezes por meio de centrifugação e dessa vez o sobrenadante proveniente de cada lavada foi recolhido, pois contém a proteína de interesse eluída. O propósito de lavar a coluna com estes três tampões um após o outro é que os tampões apresentam concentrações crescentes de imidazol (5mM, 20mM e 1M, respectivamente), e isso

faz com que a proteína seja eluída ao final do processo devido as *beads* da coluna de Níquel apresentarem uma afinidade maior pelo imidazol em relação à cauda de histidina da rP21.

O eluato proveniente da lavagem com o *elute buffer* foi colocado em uma membrana de 3,5 kDa semipermeável (Spectra/Por 131198) e submetido à diálise em PBS 1x por 48 horas sob agitação contínua a 4°C para a separação da proteína dos resíduos de contaminantes acumulados durante o processo de purificação, incluindo a ureia, permitindo assim o renovelamento proteico. Terminada a diálise, a amostra purificada foi aplicada em gel de poliacrilamida para confirmação da sua presença, pureza e a concentração da proteína quantificada por Bradford (Bradford, 1976).



**Figura 1: Obtenção da forma recombinante de P21.** Para obtenção da proteína é necessário a inserção de clones do gene da P21 em bactérias *Escherichia coli*, essas bactérias são expandidas em meio LB e faz-se a lise das mesmas. Ocorre então a incubação do lisado em coluna de níquel e, posteriormente, lavagens com concentrações crescentes de imidazol e eluição da proteína. Por fim, o material eluído é dialisado em PBS (Adaptado de: Dos Santos, 2013).

### 3.5. Viabilidade Celular

Os efeitos da rP21 sobre a viabilidade das células tumorais de mama e da célula não transformada de mama foi avaliado pelo teste colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na quantidade de  $1 \times 10^4$  células por poço em 200  $\mu$ L do meio de cultura específico para cada tipo celular. No dia seguinte, a rP21 foi diluída em meio de cultura em diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5 e 6,25  $\mu$ g/mL) e as células foram expostas ao tratamento durante o tempo de 72 horas. Após o término do tempo estabelecido, o meio com rP21 foi removido, as células foram lavadas com PBS 1x estéril e o meio de cultura foi repostado em um volume de 90  $\mu$ L, sendo acrescentado 10  $\mu$ L de MTT em uma concentração de 5 mg/mL. As células foram mantidas em estufa, cobertas com papel



alumínio por 4 horas. Após esse período acrescentou-se 100 µL do composto com 10% SDS diluído em 50% de dimetilformamida para a dissolução dos cristais de Formazan. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader, Promega, Madison, Wisconsin, EUA) a 450 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, considerando como 100% de viabilidade a absorbância das células incubadas apenas com meio de cultura (grupo controle).

### **3.6. Presença do receptor CXCR4 nas linhagens celulares (dividir citometria e confocal)**

Para determinar a presença do receptor CXCR4 nas linhagens celulares do estudo utilizamos duas técnicas distintas: a microscopia de fluorescência confocal e a citometria de fluxo. Para a primeira metodologia, as células foram plaqueadas na quantidade de  $1 \times 10^5$  células por poço, sobre lamínulas de vidro de 13 mm<sup>2</sup> (Knittel) em placas de 24 poços e deixadas em estufa a 37°C *overnight*. Após esse período, as células foram fixadas utilizando formaldeído 4% por 1 hora. Após esse período, as células foram lavadas com PBS por duas vezes e expostas ao anticorpo anti-CD184 (CXCR4) conjugado a PE (Biolegend, San Diego, Califórnia, EUA) na proporção de 3:100 µL por 1 hora a 4°C, sendo o anticorpo diluído em uma solução PGN a 0,1% de saponina. Após o período de incubação, incubou-se as lamínulas com DAPI na proporção 1:1000µL por 1 hora a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro previamente cobertas com *phenylenediamine* (PPD) e levadas ao microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha).

Já para a metodologia da citometria de fluxo, as células foram removidas das garrafas de cultura em uma confluência de 80%. Após a contagem, as células foram separadas em tubos de citometria na quantidade de  $2 \times 10^5$  por tubo. As células foram fixadas utilizando formaldeído 4% por 1 hora e após esse período, lavadas com PBS por duas vezes e expostas ao anticorpo anti-CD184 (CXCR4) conjugado a PE (Biolegend, San Diego, Califórnia, EUA) na proporção de 3:100 µL por 1 hora a 4°C, sendo o anticorpo diluído em uma solução PGN a 0,1% de saponina. Após o período de incubação, as células foram levadas ao citômetro de fluxo Cytotflex (Beckman Coulter's, Brea, Califórnia, EUA) e 12.000 eventos foram adquiridos. As análises foram feitas no software Kaluza (Beckman Coulter's, Brea, Califórnia, EUA).

### **3.7. Ensaio de ligação da proteína rP21 às células de mama**

A fim de identificar se a proteína realmente liga-se à membrana plasmática das linhagens celulares estudadas foi realizado um ensaio por citometria de fluxo para a marcação da proteína rP21.

As duas linhagens celulares foram tratadas por 1 hora com 100 µg/mL da proteína rP21. Após esse tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com o anticorpo primário policlonal IgY anti-rP21 (Ribeiro, 2016) diluído na proporção de 1:10 em PBS com 2,5% de BSA por 1 hora. Finalizado o período de incubação, as células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Anti-IgY conjugado com FITC diluído 1:1000 em PBS com 2,5% de BSA por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS e 12.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo BD FACSVerse (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). As análises foram feitas no software Kaluza (Beckman Coulter's, Brea, Califórnia, EUA).

### **3.8. Níveis do receptor CXCR4 após o tratamento com a rP21**

A fim de verificar se o tratamento com a proteína recombinante P21 influencia nos níveis do receptor CXCR4 na membrana plasmática das células realizou-se citometria de fluxo para marcação do receptor de quimiocinas.

Assim, tanto as células MCF-10A quanto as células MDA-MB-231 foram colocadas em tubos de citometria de fluxo na quantidade de  $2 \times 10^5$  células por tubo. As células foram divididas em dois grupos: grupo sem tratamento com rP21 e grupo tratado com a rP21. No grupo tratado foi adicionado 100 µg/mL da proteína rP21 por 1 hora. Nesse período, os dois grupos ficaram incubados a uma temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final desse tempo, todos os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm, em seguida, lavados com PBS por uma vez e após a lavagem, as amostras foram incubadas com o anticorpo Anti-CD184 (CXCR4) conjugado com PE por 1 hora. Finalizado esse tempo, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em PBS e então 12.000 eventos foram adquiridos no citômetro Cytoflex (Beckman Coulter's, Brea, Califórnia, EUA). As análises foram feitas no software Kaluza (Beckman Coulter's, Brea, Califórnia, EUA).

### **3.9. Imunocolocalização do receptor CXCR4 após o tratamento com a rP21**

Para avaliar a possível co-localização entre rP21 e CXCR4, as células MCF-10A e MDA-MB-231 foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 13 mm<sup>2</sup> (Knittel) em placas de 24 poços, na quantidade de  $1 \times 10^5$  células por poço. No outro dia, as células foram tratadas com

rP21 e mantidas com o tratamento por 24 horas. Após esse tempo, as células foram fixadas por 1 hora com formaldeído 4%, lavadas com PBS1x por duas vezes e então colocadas em contato com o anticorpo primário IgY anti-rP21 (1:10) diluído em PGN a 0,1 % de saponina, *overnight* a 4°C. No outro dia, o anticorpo primário foi removido, as lamínulas lavadas e colocou-se os anticorpos: secundário anti-IgY conjugado a FITC, anti-CXCR4 conjugado com PE (Biolegend) e DAPI 1:1000 por 1 hora. Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas e montadas as lâminas utilizando o antifading PPD. As lâminas foram levadas ao microscópio de fluorescência confocal e as imagens obtidas nas objetivas de 40x e 63x (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha).

### 3.10. Migração horizontal celular

Para avaliar a influência da proteína na migração horizontal das células foi realizado o ensaio de *wound healing*. Para tal, foram plaqueadas  $7 \times 10^4$  células em placas de 24 poços e cultivadas até confluência de aproximadamente 80% a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após, foi realizado a “ferida” ou o risco nos poços utilizando uma ponteira de 10 µL. O meio foi removido dos poços e feita a lavagem com PBS 1X para remoção das células que soltaram. Logo, foram adicionados os tratamentos, que foram realizados na ausência de soro fetal bovino e separados nos grupos: grupo controle, que tinha apenas meio de cultura, sendo considerado o controle negativo de migração, grupo tratado com CXCL12 (20 ng/mL) (Prospec Protein Specialists) o controle positivo de invasão, grupo tratado com rP21 (100 µg/mL) e grupo com pré-tratamento com rP21 (100 µg/mL) por 1 hora e seguinte exposição ao CXCL12 (20 ng/mL), sendo todos os tratamentos mantidos por 72 horas.

A fim de avaliar a migração horizontal das células foram capturadas imagens nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, sendo que a migração horizontal de células foi expressa como a porcentagem de fechamento da ferida (risco):  $\% \text{ de migração horizontal} = [(At = 0h - At = \Delta h) / At = 0h] \times 100\%$ . Onde,  $At = 0h$  é área do risco mensurada no tempo zero e  $At = \Delta h$  é área do risco no tempo avaliado. A migração celular foi avaliada de acordo com a área livre de células com o auxílio do software ImageJ.

### 3.11. Invasão/migração celular

Para o ensaio de invasão/migração celular foram utilizados *transwells* (Corning Inc, Nova Iorque, EUA) recobertos por uma camada de matrigel (Corning Matrigel Growth Factor Reduced, Corning Inc, Nova Iorque, EUA). A membrana presente nos *transwells* possui poros

de 8  $\mu\text{m}$ , quando os *transwells* são recobertos por matrigel, ocorre a mimetização da matriz extracelular. Para o início do ensaio, os *transwells* foram inseridos em placas de 24 poços e adicionados a eles 60  $\mu\text{L}$  de matrigel (1 mg/mL diluído em meio de cultura sem soro fetal bovino, a placa foi mantida na estufa a 37°C por aproximadamente uma hora, para o endurecimento do matrigel. Para a realização do experimento foram utilizadas  $1 \times 10^5$  células em meio sem soro em cada *transwell*. Para realização do ensaio, as células foram colocadas na parte superior dos *transwells* com 300  $\mu\text{L}$  de meio incompleto e na porção inferior colocou-se 500  $\mu\text{L}$  de meio em quatro situações: apenas meio de cultura, como controle negativo de invasão, meio com 20 ng/mL de CXCL12, como controle positivo de invasão, meio com 100  $\mu\text{g/mL}$  de rP21 e no último grupo as células foram pré-incubadas com 100  $\mu\text{g/mL}$  de rP21 por 1 hora e após esse tempo foram colocadas na região superior do *transwell* e na região inferior foi colocado meio com CXCL12. Após 72 horas, os meios foram removidos e as células que não migraram foram removidas da porção superior com *swab*. Para corar as células que migraram presentes na superfície inferior da membrana do *transwell* foi colocado 300  $\mu\text{L}$  de cristal de violeta em um poço e o *transwell* mantido no corante por 5 minutos. Após esse tempo, foram feitas lavagens com água e foram secos ao ar. Para a contagem das células que invadiram foram feitas fotografias utilizando o microscópio Leica ICC50 (Wetzlar, Alemanha) pelo software Las Ez. Foram contadas as células de aproximadamente 20 campos, sendo equivalente a toda membrana, com o auxílio do software Image J.

### 3.12. Ciclo celular

Para a análise do ciclo celular após os tratamentos foi analisado a quantidade de DNA por meio de citometria de fluxo. Para o desenvolvimento da metodologia, tanto as células MCF-10A quanto a MDA-MB-231 foram plaqueadas na quantidade de  $7 \times 10^4$  células por poço. Após a adesão celular, os tratamentos foram divididos nos seguintes grupos: controle (apenas meio de cultura), CXCL12 (20 ng/mL), rP21 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e pré-tratadas com rP21 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) por 1 hora e depois expostas ao CXCL12 (20 ng/mL), sendo os tratamentos mantidos por 72 horas, na presença de SFB.

Após o tempo de 72 horas, as células foram desaderidas, lavadas uma vez com PBS e então foram fixadas com álcool 70% gelado, sendo adicionado 300  $\mu\text{L}$  de PBS 1x e 700  $\mu\text{L}$  de álcool etílico absoluto gelado. As amostras fixadas foram mantidas *overnight* a 4°C. Após, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em uma solução contendo RNase A (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e iodeto de propídio (PI) (10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 45 minutos. As amostras foram levadas ao citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman

Coulter's, Brea, Califórnia, EUA), foram capturados 12.000 eventos e o conteúdo de DNA foi analisado no software Kaluza (Beckman Coulter's, Brea, Califórnia, EUA). Para quantificar a % de inibição do ciclo celular dos tratamentos com a rP21 em relação ao CXCL12, na fase G1 foram subtraídas as porcentagens de células tratadas com rP21 em relação as porcentagens de células tratadas com CXCL12. Na fase S, as porcentagens de células tratadas com CXCL12 foram subtraídas das porcentagens de células tratadas com rP21.

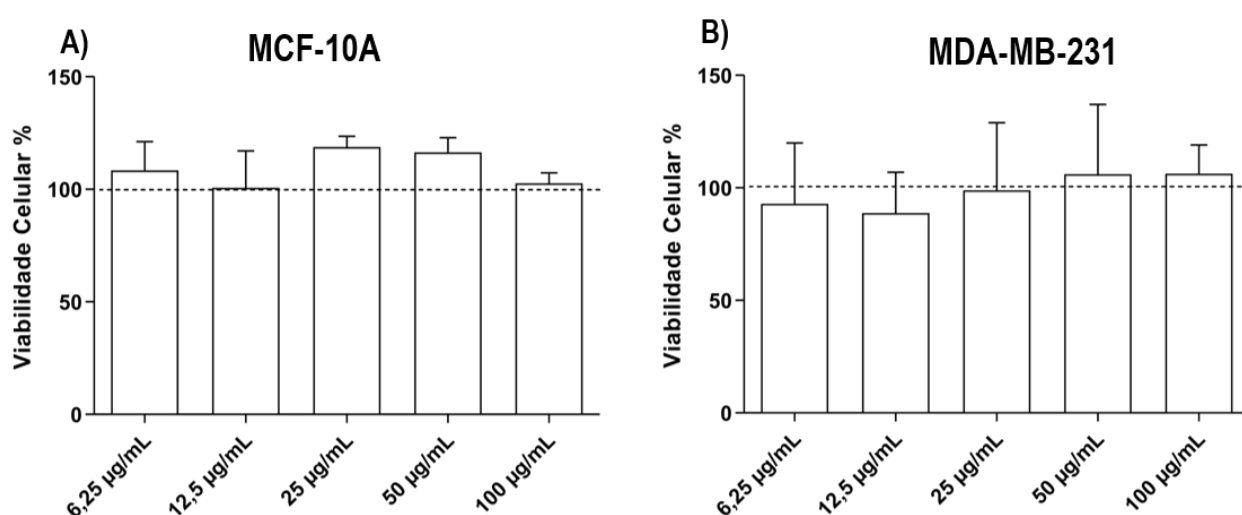
### **3.13. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., USA). A distribuição dos dados foi analisada pelos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk). Foi utilizado o teste t de Student para testes com duas variáveis, One-way e Two-way ANOVA em ensaios com mais de duas variáveis e teste de Tukey como pós-teste. A distribuição das variáveis é representada pelas médias e erro padrão. Todos os valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. rP21 não é citotóxica para as células tumorais ou para as células normais de mama

A fim de verificar se a rP21 teria ação tóxica nas linhagens celulares MCF-10A e MDA-MB-231, as células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações da proteína recombinante pelo tempo de 72 horas. De acordo com os resultados obtidos pelo ensaio de MTT, a proteína rP21 não é citotóxica em nenhuma das concentrações utilizadas, para nenhum dos tipos celulares (**Figura 2**). Assim, a maior concentração (100  $\mu\text{g/mL}$ ) foi escolhida para dar continuidade aos experimentos. Estudos anteriores mostraram que a rP21 de *T. cruzi* não é citotóxica em nenhum tipo celular como: macrófago peritoneal, células endoteliais e células de tumor de mama de camundongo (TEIXEIRA *et al.*, 2017, BORGES, 2015). Entretanto, a ausência de efeitos deletérios na replicação e viabilidade das células estudadas não indica que a rP21 não apresente efeitos biológicos. O uso da rP21 se mostra potencialmente benéfico no contexto tumoral, uma vez que ela inibe a formação de vasos sanguíneos e induz a migração de neutrófilos e macrófagos (TEIXEIRA *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2015). A partir dessas informações e sabendo que a rP21 liga-se ao receptor CXCR4 de macrófagos, foi verificado se essa ligação também ocorre no CXCR4 expresso por células tumorais e não tumorais de mama.

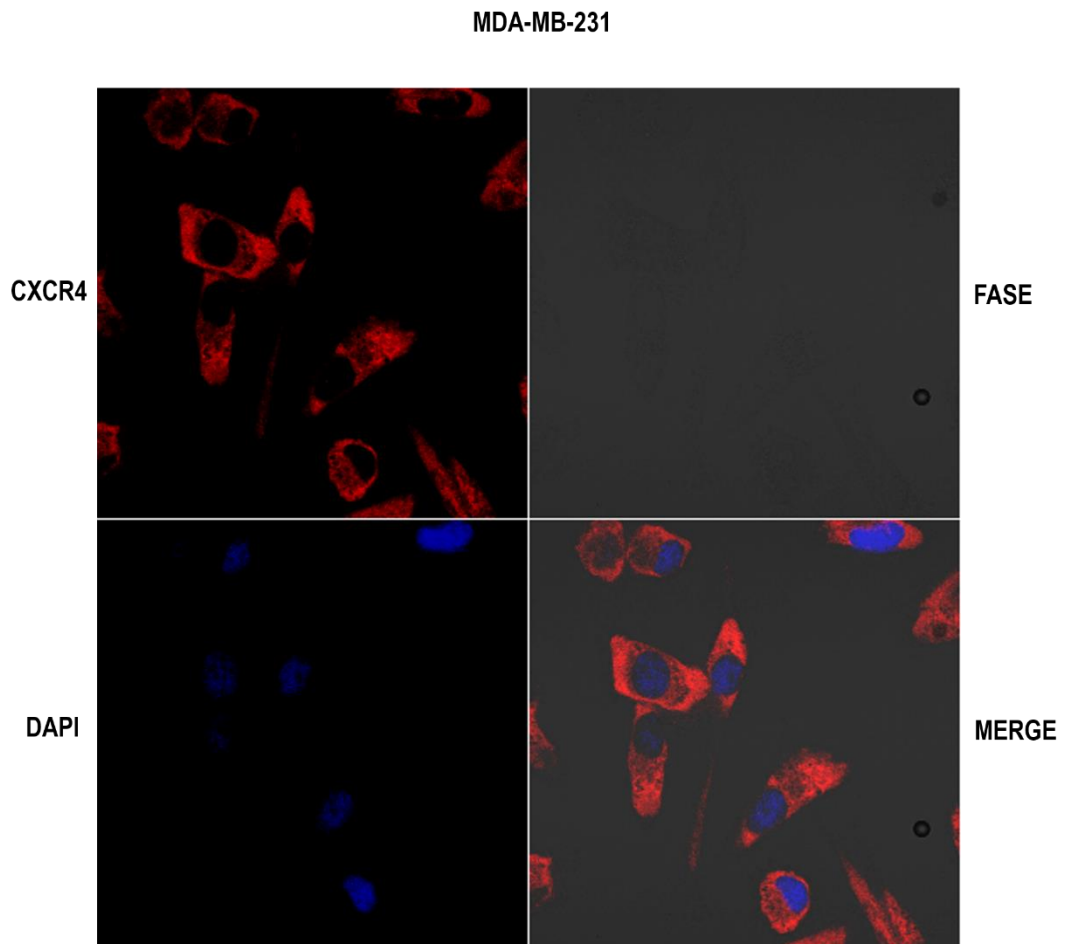
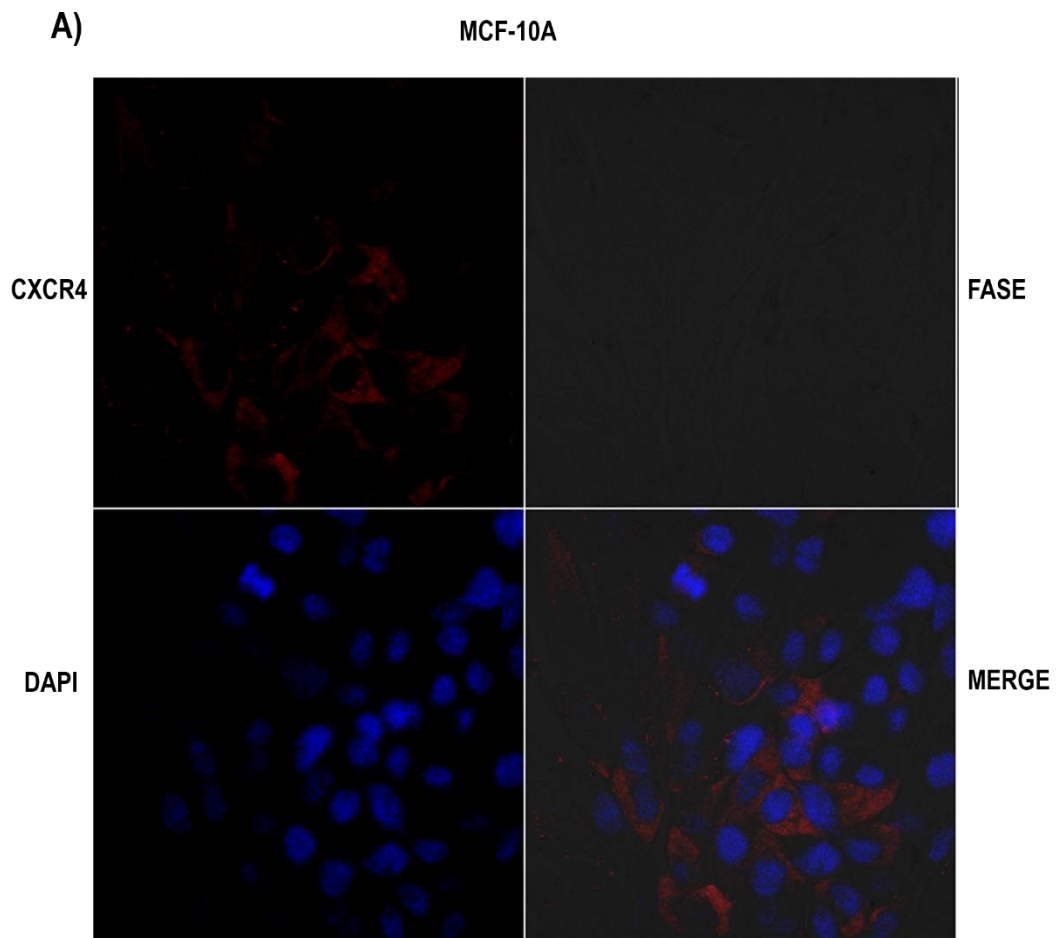


**Figura 2: rP21 não apresentou toxicidade às linhagens celulares.** As células foram tratadas com diferentes concentrações de rP21 (100, 50, 25, 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) pelo tempo de 72 horas. A proteína não tem ação citotóxica em nenhum dos tipos celulares A) MCF-10A e B) MDA-MB-231. Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão.

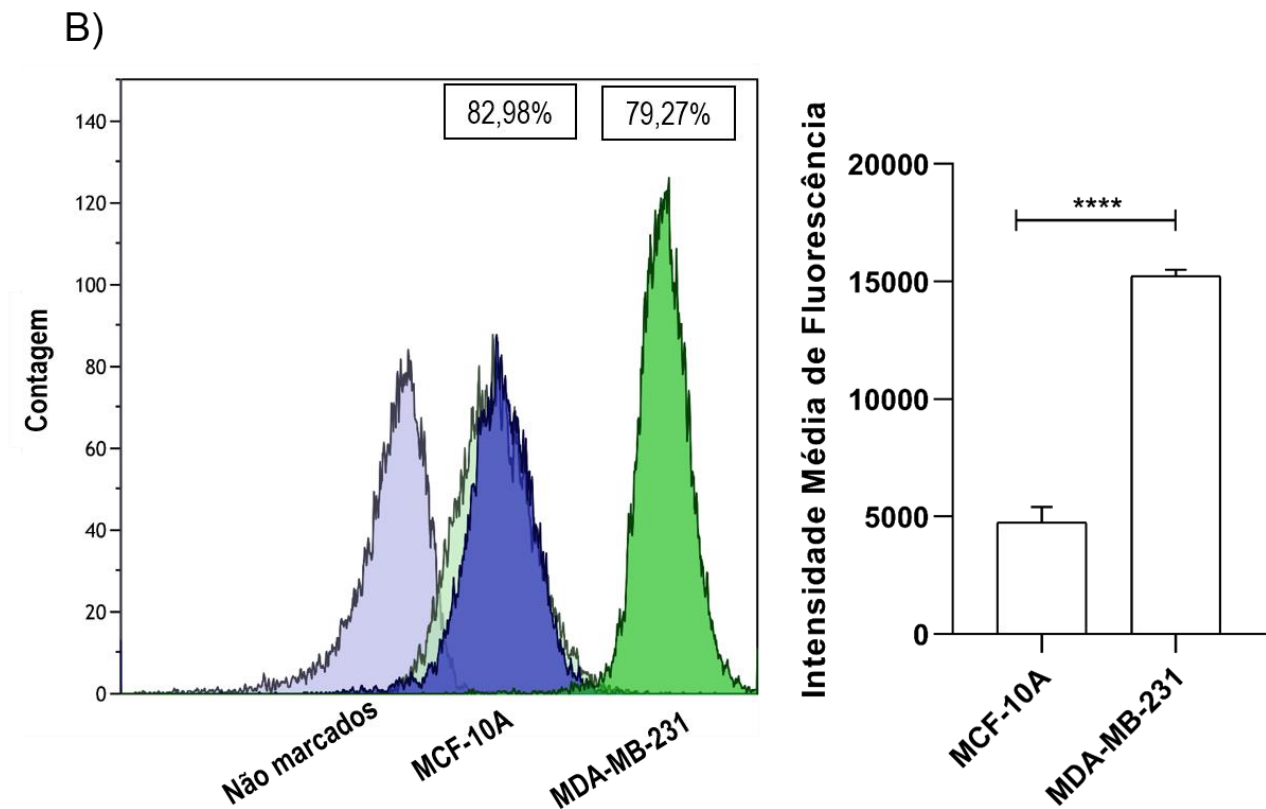
#### **4.2. A proteína recombinante P21 é capaz de ligar-se às células tumorais de mama e às células normais pelo receptor CXCR4**

O CXCR4 é um receptor de quimiocinas que tem como ligante principal CXCL12 (COJOC; PEITZSCH, 2013). Esse receptor é amplamente distribuído em várias células do organismo, principalmente, em células progenitoras da medula óssea e leucócitos e, desempenha diversas funções necessárias como o estímulo à sobrevivência, a proliferação e quimiotaxia celular (BALKWILL, 2004). Alguns tipos de células tumorais, como células tumorais de próstata, da glia, do epitélio de cabeça e pescoço, do pâncreas e células tumorais de mama superexpressam esse receptor quando comparadas com as células não tumorais (BALKWILL, 2004). Assim, CXCR4 tem sido estudado como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de diversos tipos de neoplasias (ZHOU *et al.*, 2018).

Nesse contexto, investigou-se a presença do receptor CXCR4 nas linhagens celulares estudadas. Os resultados mostram que a MDA-MB-231 expressa mais CXCR4 do que a linhagem MCF-10A (**Figura 3 A, B**). Apesar do CXCR4 estar mais presente na célula tumoral, a porcentagem de células positivas para a marcação do CXCR4 entre as células tumorais e as células normais foi semelhante. Esses dados corroboram com dados da literatura que mostram que a porcentagem de células positivas para o receptor CXCR4 em um painel de células de mama, incluindo células epiteliais não transformadas (MCF-10A), células malignas não invasivas (MDA-MB-453, MDA-MB-134 e MDA-MB-468) e células altamente invasivas (MDA-MB-231 e BT-549) é uniforme em todas as linhagens (HOLLAND *et al.*, 2006).

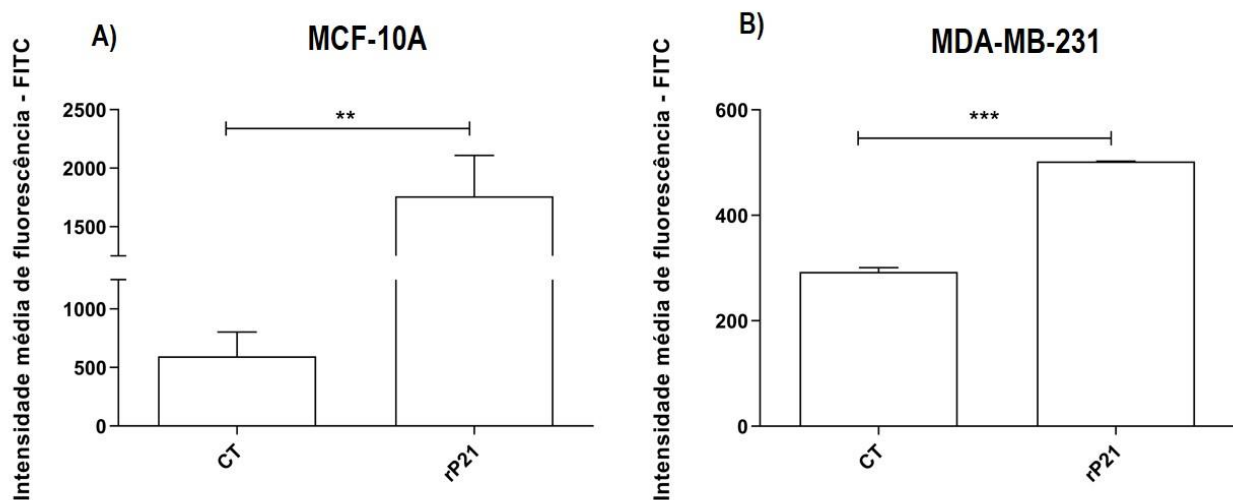






**Figura 3: MDA-MB-231 possui maior quantidade do receptor CXCR4 do que as células MCF-10A.** Microscopia de fluorescência e citometria de fluxo foram realizadas para análise da expressão de CXCR4. A) Imunofluorescência das células MDA-MB-231 e MCF-10A. Imagens representativas da expressão do CXCR4, obtidas na objetiva de 63x. B) Análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência da marcação para o CXCR4. Os dados indicam que a célula tumoral MDA-MB-231 possui uma maior quantidade expressa do receptor CXCR4 do que as células MCF-10A, sendo que as porcentagens de células positivas são de 79,27% e de 82,98%, respectivamente. O histograma e o gráfico de barras mostram a diferença na quantidade de receptor CXCR4 entre os tipos celulares.

Após demonstrar a diferença na expressão de CXCR4 nas duas linhagens celulares, analisou-se a capacidade da proteína rP21 em ligar-se à membrana plasmática. As células foram tratadas por 1 hora com a rP21 e realizada a marcação da proteína recombinante utilizando o anticorpo policlonal IgY anti-rP21 e com isso demonstrou-se que o tempo de tratamento de 1 hora com a rP21 é suficiente para que ocorra a ligação da proteína recombinante à membrana dos dois tipos celulares (**Figura 4**).



**Figura 4: rP21 é capaz de ligar-se às células MCF-10A e MDA-MB-231.** Por citometria de fluxo, a ligação da rP21 aos tipos celulares foi identificada: em A) MCF-10A e em B) MDA-MB-231. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os dados são mostrados em média  $\pm$  erro padrão. Análise das diferenças entre o grupo controle e o grupo tratado foram realizadas pelo teste T-student (GraphPad Prism software, 8.0). Estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

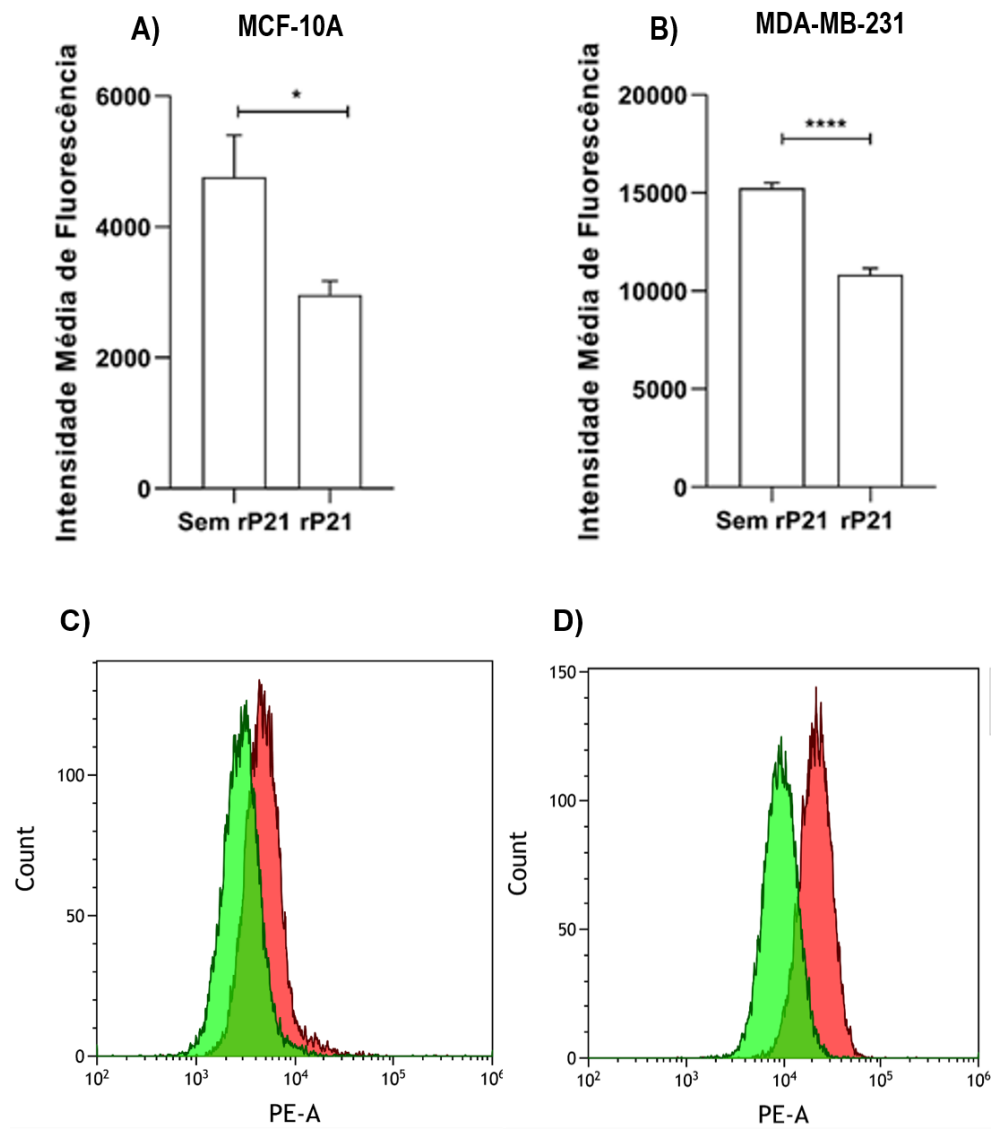
A fim de demonstrar a interação entre rP21 e CXCR4 nas células não tumoral e tumoral de mama, realizou-se as técnicas de citometria de fluxo e microscopia confocal. Notou-se que o tratamento com a rP21 reduz a expressão superficial do receptor, sugerindo que a proteína recombinante se liga a mesma região que o anticorpo anti-CXCR4 ou que o receptor estivesse internalizado (**Figura 5 A - D**). Para demonstrarmos a interação entre essas moléculas e uma possível colocalização entre elas, foi feito o tratamento das células com a rP21 por 24 horas e, nesse tempo, foi possível detectar a proteína recombinante no citoplasma das células MDA-MB-231, sendo que a marcação da proteína coincide com a marcação mais intensa do receptor CXCR4. Já na célula MCF-10A, a internalização da proteína não acontece, visto que nesse tempo de tratamento não foi possível detectar rP21 no citoplasma das células (**Figura 5E, F**). Esses dados mostram que a rP21 liga-se ao receptor CXCR4, porém só é internalizada pela célula tumoral.

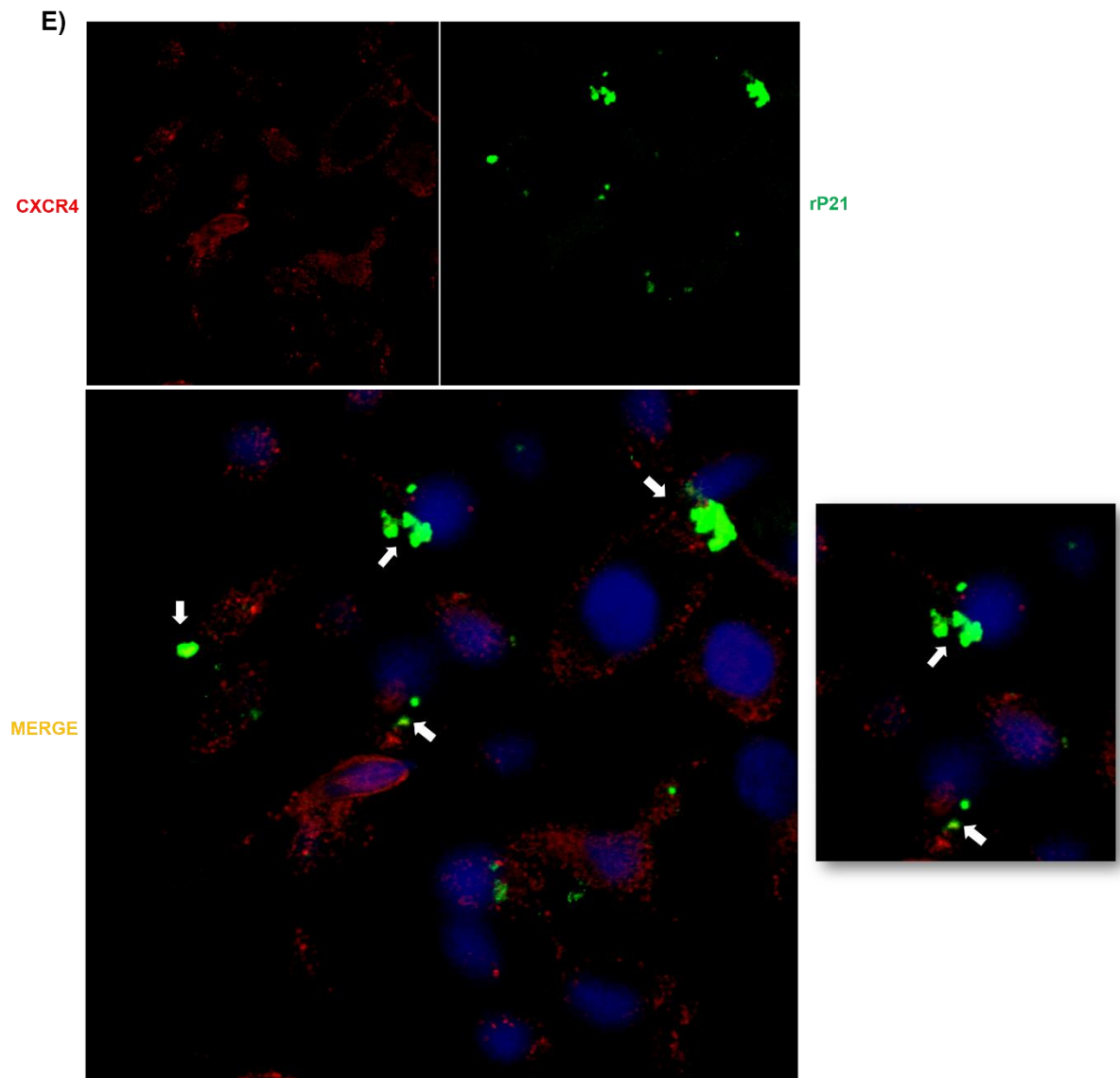
A internalização dos receptores de quimiocina ocorre após a ligação com o seu ligante. O tempo da internalização do receptor pode variar de acordo com o ligante e com o tipo celular (NEEL *et al.*, 2005). Sabe-se que o ligante principal do CXCR4 é a quimiocina CXCL12 e, quando ocorre essa ligação a proteína G é ativada e, consequentemente, vias de sinalização

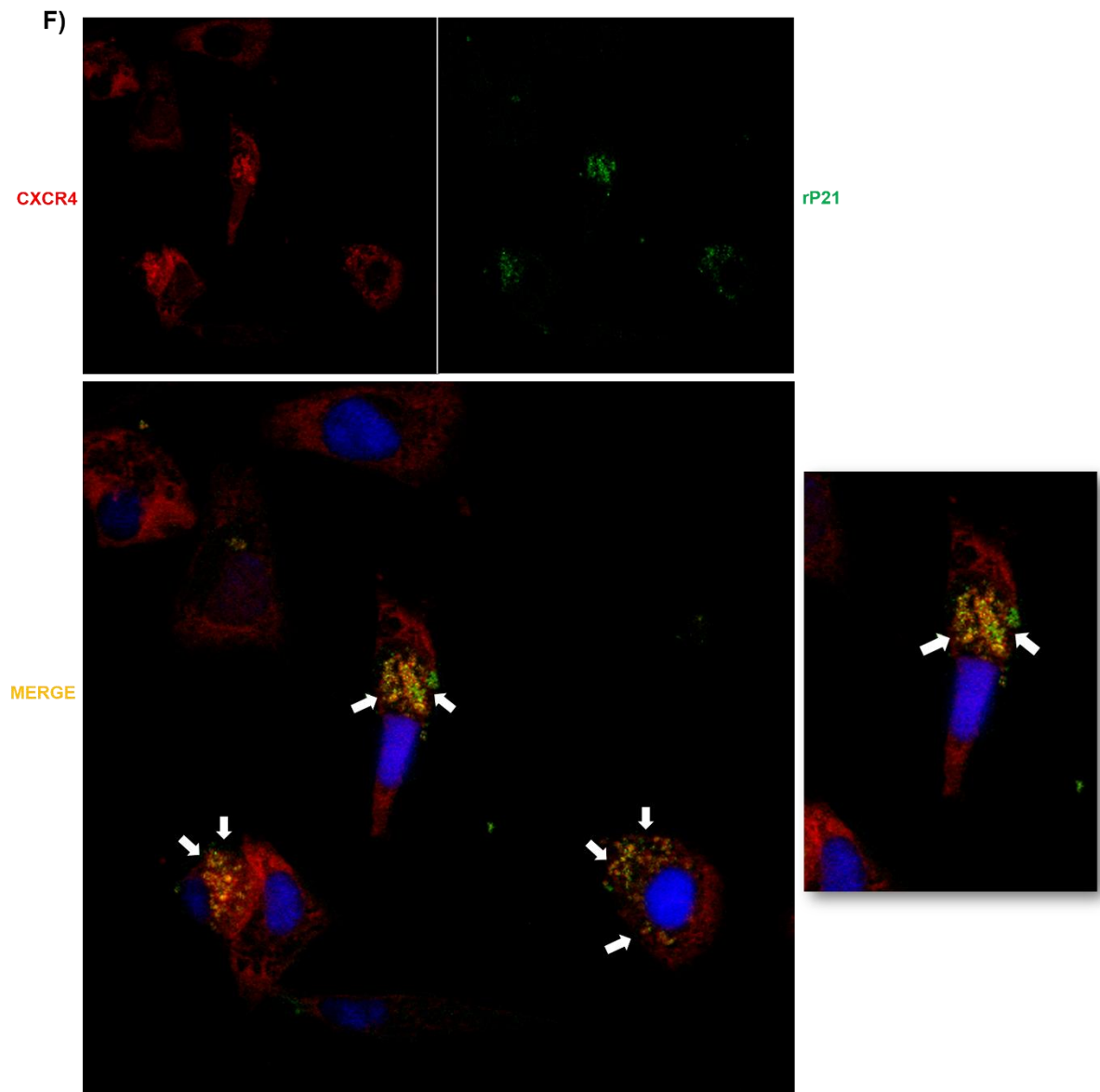
como MAPKs, PLC, PI3K/AKT são ativadas garantindo quimiotaxia, proliferação, migração e sobrevivência das células, gerando um *feedback* positivo entre o receptor e a vias de ativação (ZHAO; YAO, 2015). Uma outra situação que pode ocorrer após a ligação do CXCL12 ao CXCR4 é a indução de sinais independentes da proteína G, nesse caso, GRK é ativado e ativa a molécula  $\beta$ -arrestina. Essa ativação causa a internalização e a dessensibilização do receptor CXCR4 (ZHAO; YAO, 2015). Dessa forma, percebemos que a internalização do receptor não necessariamente, culmina com a ativação de vias descritas, se ocorrer a dessensibilização do receptor, as cascatas de sinalização podem não ocorrer. Uma situação que gera a dessensibilização do receptor CXCR4 é a exposição prolongada das células ao CXCL12 em condições fisiológicas (MARCHESE *et al.*, 2003). Em células tumorais que superexpressam o CXCR4, a dessensibilização desse receptor faria com que características como a invasão e migração celular fossem inibidas.

A expressão do receptor CXCR4 pode ser modulada por diversos compostos, sendo que muitas moléculas possuem a ação de aumentar a sua expressão na membrana de diferentes células, tanto células tumorais quanto células normais. A ciclofosfamida é capaz de aumentar a expressão de CXCR4 na membrana de células MDA-MB-231 e, com isso, causar um aumento nos índices de invasão e migração dessas células (HUNG *et al.*, 2016). O fator de crescimento heregulin (HRG), ligante dos receptores de crescimento Erb3 e Erb4, também induz um aumento da expressão de CXCR4 na membrana de células tumorais de mama MCF-7, BT-474 e MDA-MB-361 e, assim, aumenta as características malignas dessas células (LOPEZ-HABER *et al.*, 2016). O aumento da expressão do CXCR4 na membrana de células MCF-10A faz com que essas células passem a ter um perfil de células invasivas e, conseqüentemente, possam se transformar em células tumorais de mama (SU *et al.*, 2011). Dessa forma, compostos que atuem de maneira a diminuir a expressão do CXCR4 e possam levar a internalização e dessensibilização do receptor são promissores para o tratamento de tumores que superexpressem esse receptor.

De acordo com os nossos resultados, a rP21 é uma proteína que têm a capacidade de ligar-se ao receptor CXCR4 e, em um tempo menor de tratamento, diminui os níveis desse receptor na membrana tanto da célula normal quanto da célula tumoral. No entanto, em tempos maiores de tratamento, só foi possível verificar a rP21 internalizada nas células MDA-MB-231, sendo a marcação da rP21 compatível às regiões de maior marcação do receptor CXCR4. Diante disso, qual seria o impacto biológico da interação entre rP21 e o receptor CXCR4 nessas duas linhagens celulares?







**Figura 5: rP21 diminui os níveis do receptor CXCR4 na membrana das células MCF-10A e MDA-MB-231, mas é internalizada e co-localizada com o CXCR4 apenas das células MDA-MB-231.** Para verificar os níveis de CXCR4 nas membranas das células, o tratamento com a rP21 100 µg/mL foi realizado pelo tempo de 1 hora. A análise mostrou que o tratamento com a rP21 diminui os níveis do receptor CXCR4 na membrana. Tal efeito ocorre tanto na célula MCF-10A (A, C) quanto na MDA-MB-231 (B, D) causando uma maior diferença estatística nesse último tipo celular. Nos histogramas: rosa: grupo sem tratamento, verde: grupo tratado com rP21. Para a imunocolocalização, as células foram tratadas por 24 horas com 100 µg/mL da rP21 em E) MCF-10A e F) MDA-MB-231. As setas brancas indicam a localização da rP21. Análise das diferenças foram feitas pelo teste T- student (GraphPad Prism software, 8.0). Estatisticamente significante  $p < 0,05$ .

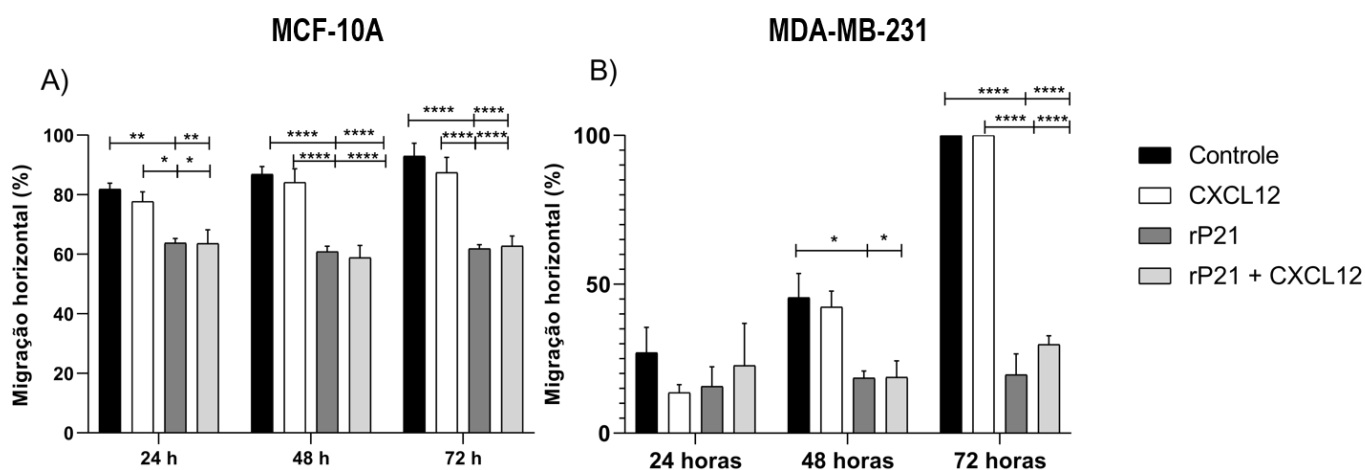
#### 4.3. A migração e invasão celular são reduzidas após o tratamento com a rP21

Sabe-se que a interação entre CXCL12/CXCR4 em células tumorais de mama, muitas vezes, geram uma maior proliferação dessas células, garante a sobrevivência e além disso estimula as células a saírem do nicho primário para uma região que tenha altas concentrações de CXCL12, causando assim, metástase do tumor de mama (LIEKENS; SCHOLS; HATSE, 2010; MUKHERJEE; ZHAO, 2013). A metástase tumoral é complexa e necessita de etapas como a dissociação de células do tumor primário, invasão dessas células e angiogênese (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002; STEEG, 2006). Sabendo da capacidade da rP21 em impedir a formação de vasos sanguíneos (TEIXEIRA *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2015), o próximo passo foi verificar a ação da proteína recombinante na invasão de células tumorais.

Para avaliar os efeitos da rP21 sobre a migração e invasão de ambas as linhagens celulares foram realizados os ensaios de *wound healing* e *transwell*, sendo os dois ensaios realizados no tempo de 72 horas. A migração horizontal (*wound healing*) das células MCF-10A ao final do tempo de tratamento foi na média de 61% no grupo tratado com a rP21 e de 62% no grupo pré-tratado com rP21 e expostos ao CXCL12 (**Figura 6A**). Já a migração horizontal das células MDA-MB-231 nos grupos tratados foi na média de 14% de fechamento para o grupo tratado com a rP21 por 72 horas, enquanto o grupo pré-tratado com a rP21 e exposto ao CXCL12 teve uma média de fechamento de 29% (**Figura 6B**). O ensaio também foi realizado na presença de SFB, para verificar que a ausência do SFB não interfere na viabilidade e nem na adesão das células (dados não mostrados).

Esses dados mostram que o tratamento com a rP21 diminui a migração horizontal, principalmente, das células MDA-MB-231 e, além disso, o pré-tratamento das células com a

rP21 faz com que a ação do CXCL12 não ocorra de forma efetiva como quando esta citocina é colocada sozinha. Assim, a rP21 parece reduzir o efeito dessa citocina no receptor CXCR4.



**Figura 6: rP21 reduz a migração horizontal das células MDA-MB-231.** Após a confecção da “ferida” nas células plaqueadas, foram colocados os tratamentos: **Controle**: apenas meio de cultura, **CXCL12**: tratamento com 20 ng/mL, **rP21**: tratamento com 100 µg/mL, **rP21 + CXCL12**: pré-tratamento com 100µg/mL de rP21 por 1 hora e depois tratamento com 20 ng/mL de CXCL12. A capacidade de migração dessas células foi analisada após 24, 48 e 72 horas. A) MCF-10A, B) MDA-MB-231. Dados expressos como média ± erro padrão. Análise estatística feita utilizando Two-way Anova e Teste de Tukey (GraphPad Prism software, 8.0). Estatisticamente significativo quando  $P < 0,05$ , sendo \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

No ensaio de invasão/migração celular utilizando os *transwells* com matrigel foi visto que a presença da rP21 por 72 horas é capaz de diminuir a invasão/migração tanto das células MCF-10A quanto das células MDA-MB-231 quando comparadas ao controle positivo. Ao transformar o número de células que ultrapassaram o matrigel em porcentagem, é possível verificar que a média para a MCF-10A foi de 73,8%, enquanto a de células MDA-MB-231 é 35,7%. Dessa forma, mesmo havendo uma diminuição na invasão/migração das células normais, a redução maior foi observada nas células tumorais. Comparando diretamente o número de células total que sofreram invasão com o tratamento com a rP21, entre as duas linhagens celulares, a diferença é nítida (**Figura 7C**).

Quando comparamos a taxa de invasão das células com o controle negativo é visto que as células MCF-10A (**Figura 7 A, C**) quando expostas a rP21 por 72 horas tem um maior número de células que ultrapassaram o matrigel, já a invasão das células MDA-MB-231 (**Figura 7 B, D**) não possui diferença do controle negativo. Esses dados mostram que a rP21



atua nas células tumorais de mama de maneira que a invasão celular é mais próxima ao controle negativo, enquanto nas células normais de mama quando comparadas ao controle negativo há uma competência quimiotática.

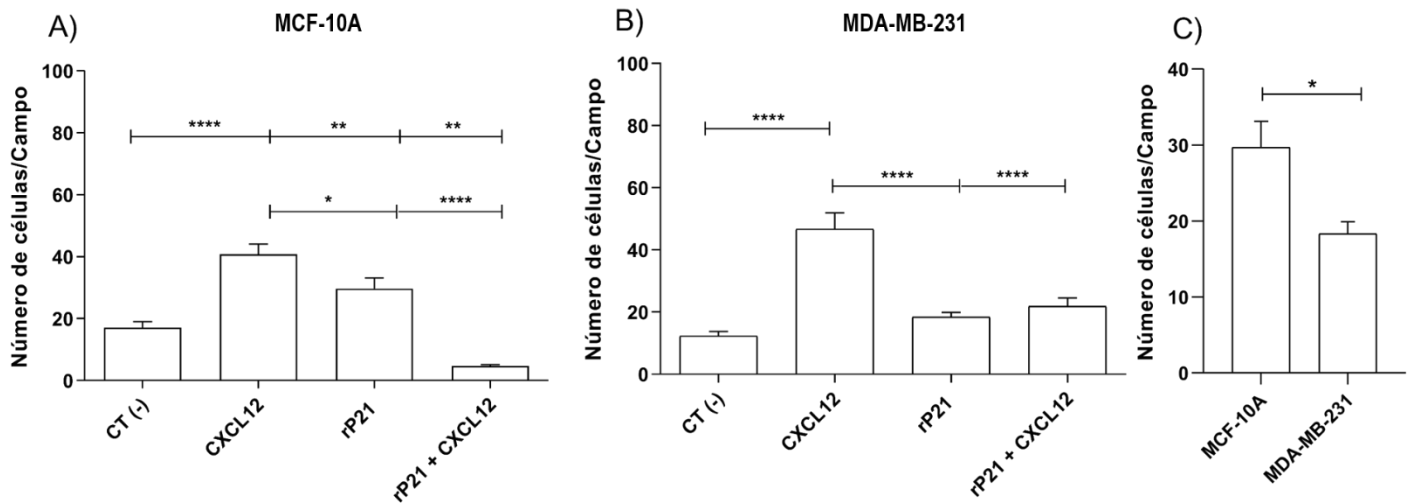
Quando ocorre o pré-tratamento com a rP21 das células e a subsequente exposição ao CXCL12, comparando-se ao controle positivo, a invasão celular também é diminuída. Tal fato reforça que a ideia de que pré-tratamento com a rP21 impede o CXCL12 de exercer seu papel quimiotático, em ambas as células, confirmando o resultado obtido no ensaio de migração horizontal.

Com esses ensaios é possível detectar que a rP21 impede a migração e a invasão de células, principalmente, da MDA-MB-231 (**Figura 7C**). Além disso, foi possível detectar que o pré-tratamento com a proteína anula a ação quimiotática do CXCL12. Sendo assim, sugere-se que o tratamento com a rP21 induz a dessensibilização do receptor CXCR4, de maneira, que CXCL12 não consiga estimular a invasão dessas células.

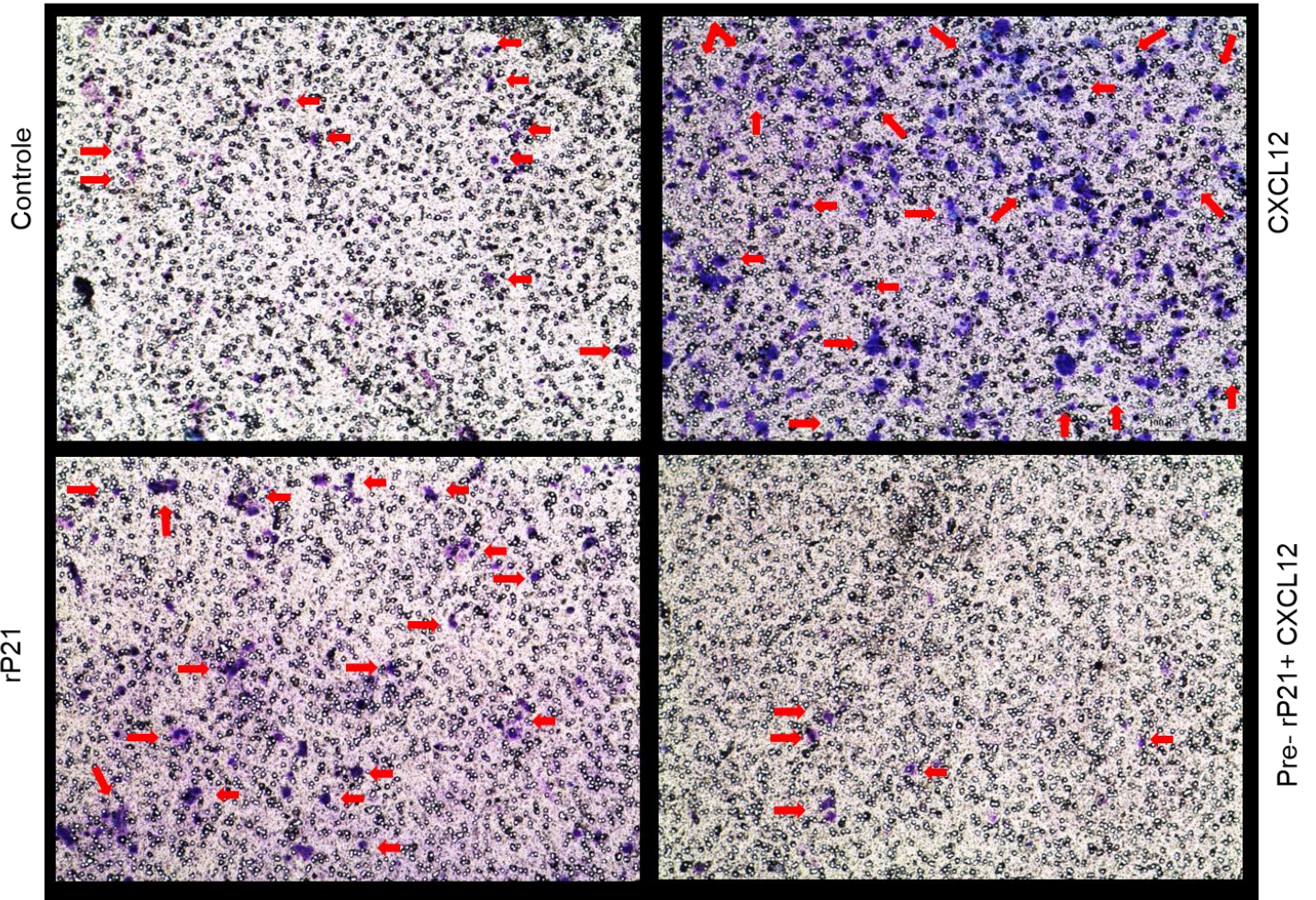
Curiosamente, estudos anteriores mostram que a proteína rP21 apresenta atividade quimiotática para macrófagos e neutrófilos *in vivo* (TEIXEIRA *et al.*, 2015) e utilizando o modelo de *transwell* foi verificada a atividade quimiotática em macrófagos peritoneais (SILVA, 2019 e BORGES, 2015). Porém essa atividade quimiotática não foi verificada em células de Ehrlich (BORGES, 2015) e nem nas células MDA-MB-231, assim percebe-se que a proteína rP21 pode agir de maneira diferente no CXCR4 de células tumorais.

Os processos de migração e invasão celular são importantes em um contexto de metástase tumoral, a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer (SONG *et al.*, 2013). Portanto, o estudo de drogas que impedem a migração/invasão de células tumorais têm sido cada vez maior. A ciclofosfamida é o princípio ativo de fármacos como Cytosan e Neosar que são amplamente utilizados no tratamento de doenças autoimunes e também em tumores malignos, como tumores de mama (HUNG *et al.*, 2016). A ciclofosfamida atua causando a morte das células tumorais MDA-MB-231 e MDA-MB-435S de maneira dose-dependente, porém também de maneira dose-depende tal princípio ativo induz a migração e invasão, principalmente, da células MDA-MB-231 (HUNG *et al.*, 2016). Ao investigarem o mecanismo de ação da ciclofosfamida nas células MDA-MB-231 foi visto que o tratamento aumenta a expressão do receptor CXCR4 na superfície dessas células, por isso, elas aumentam o processo de invasão (HUNG *et al.*, 2016). Além de células de tumor de mama, a superexpressão do receptor CXCR4 em células de câncer de pulmão aumenta a motilidade e a invasão das células, por ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e MMP-9 (ZUO *et al.*, 2017), sendo também importante para o fenótipo invasivo de células de

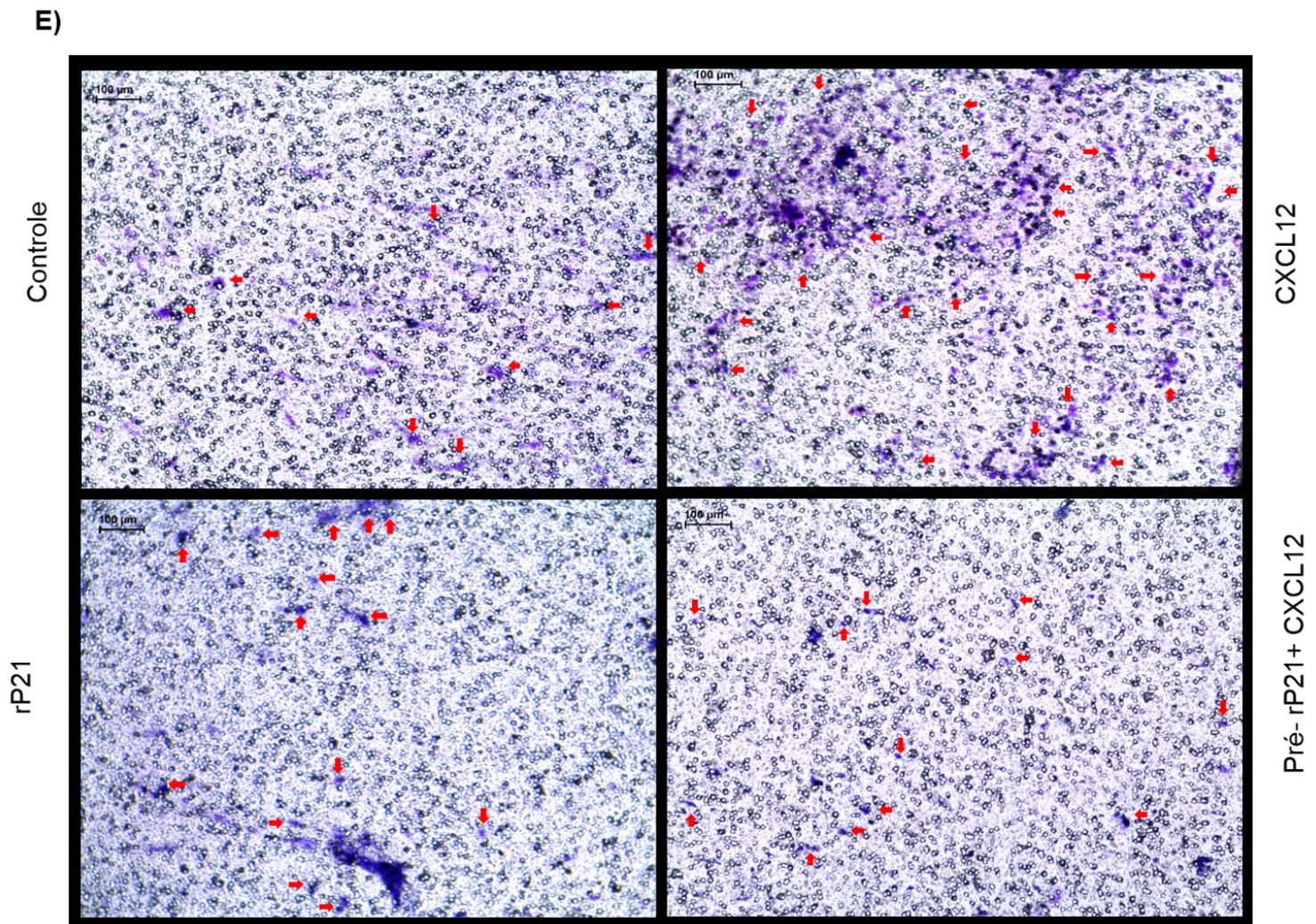
mieloma múltiplo (ULLAH, 2019), de células de tumor de pâncreas (KAYALI *et al.*, 2003) e câncer de ovário (GUO *et al.*, 2015). Células epiteliais não transformadas, como a MCF-10A, também podem sofrer a ação de compostos que estimulam a invasão dessas células e, consequentemente, têm o potencial de torná-las malignas, como o composto ácido perfluorooctanico, utilizado em cosméticos, panelas antiaderentes e encontrado na água potável (PIEROZAN; JERNEREN; KARLSSON, 2018). A transfecção de células MCF-10A para a superexpressão do receptor CXCR4 mostra que o aumento desse receptor está relacionado diretamente com alterações morfológicas e fenotípicas dessas células, aumentando seu fenótipo invasivo (SU *et al.*, 2011).



D)







**Figura 7: rP21 promove redução na invasão células MDA-MB-231.** Células normais de mama e células tumorais foram colocadas na porção superior do *transwell* contendo uma camada de matrigel, abaixo do *transwell* foi colocado o meio de cultura e o tratamento de interesse. A capacidade de invasão dessas células foi analisada após 72 horas. A e D) MCF-10A, B e E) MDA-MB-231 e C) comparação entre os tratamentos com a rP21 nas duas linhagens celulares. **Controle:** apenas meio de cultura, **Controle positivo de invasão:** tratamento com CXCL12 (20 ng/mL), **rP21:** tratamento com rP21 (100 μg/mL), **rP21 + CXCL12:** células pré-tratadas com rP21 (100 μg/mL) por 1 hora colocadas na porção superior do transwell e abaixo CXCL12 (20 ng/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como média ± erro padrão. Análise estatística feita utilizando One-way Anova (GraphPad Prism software, 8.0). Estatisticamente significativa quando  $P < 0,05$ . Barras de 100 μm representam a objetiva de 10x. Setas vermelhas indicam as células.

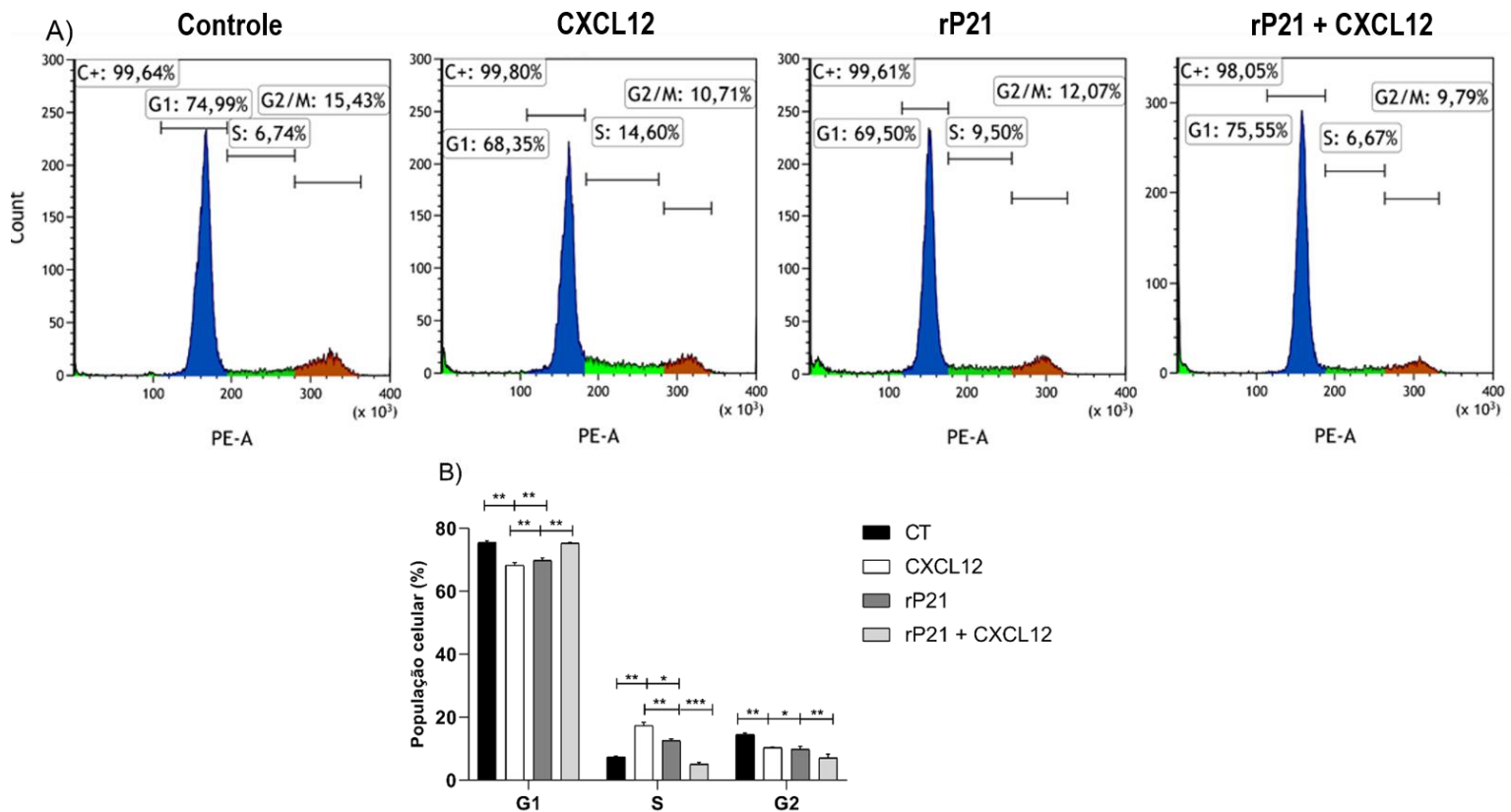
#### 4.4. rP21 atua no ciclo celular das células tumorais aumentando a fase G1

Visto a ação da rP21 na migração e invasão das células foi realizado a análise do ciclo celular após o tratamento com a rP21 em ambas as linhagens. Sabe-se que o processo de invasão celular envolve tanto a migração quanto a proliferação celular (JOHNSTON *et al.*, 2014). A proliferação celular é caracterizada como uma sequência de eventos que culmina com o surgimento de duas células-filha ao final deles. Essas etapas são divididas em fase G1, fase S, fase G2 e fase M (HAASS *et al.*, 2014).

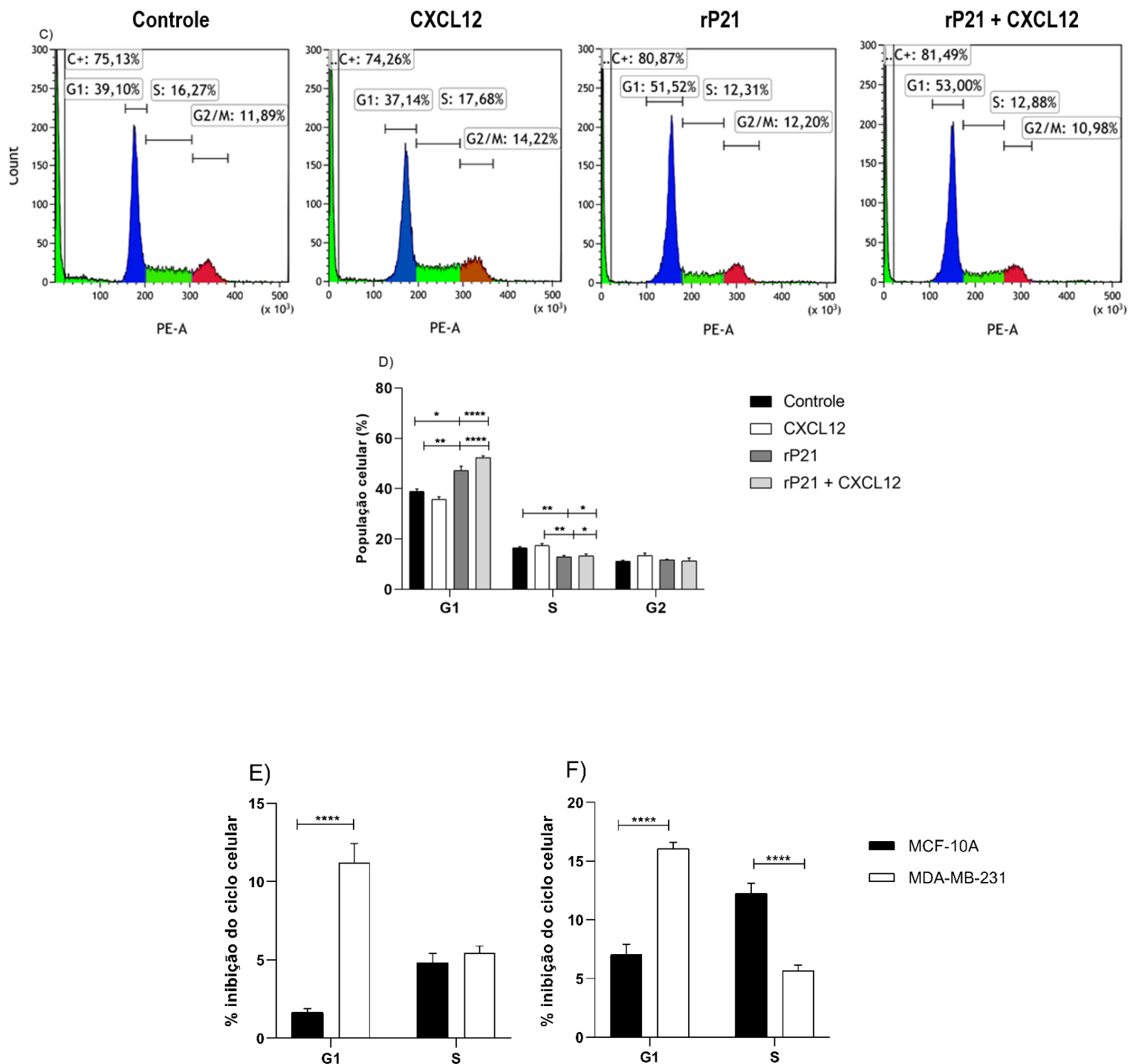
Levando-se em conta que tanto a rP21 quanto o CXCL12 ligam-se ao mesmo receptor, qual a função de cada uma dessas moléculas em relação a progressão do ciclo celular? Assim, nas células MCF-10A foi visto que tanto o tratamento com a rP21 como o pré-tratamento com a mesma podem interferir no ciclo celular dessas células de modo a diminuir a proliferação celular das mesmas, quando comparadas ao ligante CXCL12, pois ocorre um pequeno aumento na fase G1 e diminuição da fase S (**Figura 8 A, B**). Quando se observa o ciclo celular da MDA-MB-231 é visto que o tratamento com a rP21 induz as células a se acumularem na fase G1 do ciclo celular e diminuir a síntese de material genético. O mesmo efeito é visto no pré-tratamento das células com a rP21 e subsequente exposição ao CXCL12 (**Figura 8 C, D**). Os dados mostram que apesar de existir uma diferença estatística nos tratamentos das células MCF-10A sugerindo um aumento do número de células em G1 e diminuição na fase S, a alteração no ciclo celular é muito menor do que na MDA-MB-231, quando comparamos o tratamento com a rP21 entre as duas linhagens (**Figura 8 E**). A mesma situação é vista no grupo em que há o pré-tratamento das células com a rP21 e seguida exposição ao CXCL12 (**Figura 8 F**). Sendo assim, esses dados corroboram com a hipótese de que o tratamento com a rP21 induz a endocitose do receptor CXCR4 na célula tumoral e sua dessensibilização.

Sabe-se que o eixo CXCL12/CXCR4 atua fortemente na progressão do ciclo celular, inclusive, podendo gerar a transição epitélio-mesênquima e atuar no desenvolvimento de tumores (LIU *et al.*, 2018). Algumas drogas conseguem atuar acelerando o ciclo celular de células normais e essa rápida progressão do ciclo, pode culminar com o desenvolvimento de células tumorais, como o ácido perfluorooctânico em células MCF-10A (PIEROZAN; JERNEREN; KARLSSON, 2018). Dessa forma, o fato da rP21 não intervir progredindo o ciclo celular das células MCF-10A é benéfico. A ação positiva do eixo CXCL12/CXCR4 além de culminar com o desenvolvimento de células tumorais, pode auxiliar na progressão dessas células. A ativação do receptor CXCR4 em células de tumor maligno da bainha de nervos

periféricos estimula a progressão do ciclo celular, sendo que a inserção de um shRNA faz com que haja um bloqueio na progressão do ciclo dessas células, aumentando a fase G1 e não causando a morte das mesmas (MO, W. *et al.*, 2013). Já a inibição do CXCR4, pelo inibidor AMD3100 aumenta o número de células de osteosarcoma em G1, diminui as fases S e G2 e induz a apoptose dessas células (POLLINO *et al.*, 2019). O bloqueio da progressão do ciclo celular de células tumorais é importante, pois sabe-se que um ciclo celular anormal contribui para a tumorigênese e também pode influenciar no processo de migração celular (KÜMPER *et al.*, 2016). Várias drogas que causam o bloqueio do ciclo celular de células tumorais, conseguem também interferir na migração e invasão dessas células. Compostos com a ficocianina possuem ação de bloqueio do ciclo celular na fase G1 e, em consequência, a isso, diminui a invasão de células de carcinoma escamoso de esôfago (ZHANG *et al.*, 2019). O Osthol, um monômero derivado da cumarina, estimula o bloqueio do ciclo celular de células de osteosarcoma e, além disso, inibe a invasão dessas células (WANG *et al.*, 2016).







**Figura 8: rP21 interrompe a progressão do ciclo celular da MDA-MB-231.** Células MCF-10A e MDA-MB-231 foram plaqueadas e receberam os seguintes tratamentos: **Controle:** apenas meio de cultura, **CXCL12:** tratamento com 20 ng/mL, **rP21:** tratamento com 100 µg/mL, **rP21 + CXCL12:** pré-tratamento com 100µg/mL de rP21 por 1 hora e depois tratamento com 20 ng/mL de CXCL12. Após 72 horas, o ciclo celular foi analisado. O tratamento com a rP21 gera um acúmulo de células na fase G1 e diminui o número de células na fase S, mostrando que a rP21 causa uma parada no ciclo celular. A, B) MCF-10A, C, D) MDA-MB-231. Quando comparadas as duas linhagens celulares é visto que o número de células em G1 é maior nas células MDA-MB-231 do que nas células MCF-10A, tanto com E) tratamento com rP21, quanto

com F) pré-tratamento com rP21, seguido do tratamento com CXCL12. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Análise estatística feita utilizando Two-way Anova e Teste de Tukey (GraphPad Prism software, 8.0). Estatisticamente significante quando  $P < 0,05$ , sendo \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .



## 5. Conclusão

Ao término desse trabalho concluiu-se que a proteína recombinante 21 de *T. cruzi* liga-se ao receptor CXCR4 de células não tumorais e tumorais metastáticas de mama. Essa ligação diminui os níveis do CXCR4 na membrana das células em um tratamento após 1 hora, porém, após 24 horas, a internalização da rP21 ocorre apenas na linhagem MDA-MB-231, enquanto que na linhagem MCF-10A a rP21 ainda permanece na membrana plasmática. O CXCR4 internalizado colocaliza com a marcação da rP21 nas células tumorais, sugerindo que o efeito de menor resposta ao CXCL12 possa ser por causa dessa internalização do receptor provocada pela rP21, sendo esse fenômeno específico na célula tumoral. Esse fato explica o fenótipo da diminuição de migração, invasão e a progressão do ciclo celular, principalmente, da célula de mama tumoral metastática, MDA-MB-231. A partir desses dados, podemos concluir que a rP21 liga-se ao CXCR4 da MDA-MB-231 e modula negativamente algumas funções mediadas por esse receptor, o que pode sugerir a dessensibilização desse receptor.

## 6. Perspectivas futuras

Frente as conclusões obtidas nesse trabalho, entender como a internalização da rP21 ocorre apenas na célula tumoral de mama torna-se necessário e de grande importância, pois assim a rP21 poderá, futuramente, ser utilizada como uma ferramenta para inibir metástase e proliferação de células CXCR4<sup>+</sup>, sem causar a malignização de células normais.

## 7. Referências bibliográficas

- ALI, I.; HO, J.; KUH, H. Improving drug delivery to solid tumors: Priming the tumor microenvironment. **Journal of Controlled Release**. v. 201, p. 78–89, 2015. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.12.018.
- ALTENBURG, J. D. *et al.* A Naturally Occurring Splice Variant of CXCL12 / Stromal Cell-Derived Factor 1 Is a Potent Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibitor with Weak Chemotaxis and Cell Survival Activities. **Journal of virology**. v. 81, n. 15, p. 8140–8148, 2007. DOI: 10.1128/JVI.00268-07.
- ATAYDE, V., JASIULIONIS, M., CORTEZ, M., YOSHIDA, N., A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. **Melanoma Research**. v. 18, p. 172-183, 2008. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3282fecaab.
- BACHELDER, R. E.; WENDT, M. A.; MERCURIO, A. M. Advances in Brief Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Breast Carcinoma Invasion in an Autocrine Manner by Regulating the Chemokine Receptor CXCR4. **Cancer Research**. v. 62, n. 24, p. 7203–7206, 2002. PMID: 12499259.
- BATMONKH, Z., KALLINIKOVA, V.D., PAKHORUKOVA, L.V., KRAVTSOV, E.G., KARPENKO, L.P., DALIN, M.V. In vivo anticancer activity of lysates from *Trypanosoma cruzi* of different genetic groups. **Bull Exp Biol Med**. v. 142, p. 470-473, 2006. DOI: 10.1007/s10517-006-0395-6
- BALKWILL, F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. **Seminars in Cancer Biology**. v. 14, n. 3, p. 171–179, 2004. DOI: 10.1016/j.semcancer.2003.10.003
- BONOTTO, M. *et al.* Measures of Outcome in Metastatic Breast Cancer: Insights From a Real-World Scenario. **The Oncologist**. v. 19, n. 6, p. 608–615, 2014. DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0002
- BORGES, B.C. **Caracterização das atividades biológicas da proteína recombinante P21 de *Trypanosoma cruzi* sobre linhagem celular tumoral de mama *in vitro***. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12403>.
- BRADFORD, M. M. **Anal. Biochem**. v. 72, p. 248, 1976.
- BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p.394-424, 2018. DOI:10.3322/caac.21492.
- CABRAL, H., The tumoricidal effect of *Trypanosoma cruzi*: its intracellular cycle and the immune response of the host. **Med Hypotheses**, v. 54, p. 1-6, 2000. DOI: : 10.1054/mehy.1998.0808

- CLEGG, J., SMITHERS, S., TERRY, R. Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. **International Journal of Parasitology**. v. 1, p. 43–49, 1971. DOI: 10.1016/0020-7519(71)90045-2.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**. v. 2, n. 8, p. 563–572, 2002. DOI: 10.1038/nrc865.
- CHEN, L., HE, Z., QIN, L., LI, Q., SHI, X., ZHAO, S., CHEN, L., ZHONG, N., CHEN, X. Antitumor Effect of Malaria Parasite Infection in a Murine Lewis Lung Cancer Model through Induction of Innate and Adaptive Immunity. **Plos one**. v. 6, p.e24407, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0024407.
- CHEN, I. X. *et al.* Blocking CXCR4 alleviates desmoplasia , increases T-lymphocyte infiltration , and improves immunotherapy in metastatic breast cancer. **PNAS**. v. 116, n. 10, 2019. DOI: 10.1073/pnas.1815515116.
- COJOC, M.; PEITZSCH, C. Emerging targets in cancer management : role of the CXCL12 / CXCR4 axis. **Onco Targets Therapy**. p. 1347–1361, 2013. DOI: 10.2147/OTT.S36109
- DARANI, H.Y., YOUSEFI, M. Parasites and cancer: parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy. **Future Oncol**. v. 8, p. 1529–1535, 2012. DOI: 10.2217/fon.12.155.
- DEN BROK, W. D. *et al.* Survival with metastatic breast cancer based on initial presentation, de novo versus relapsed. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 161, n. 3, p. 549–556, 2017. DOI: 10.1007/s10549-016-4080-9.
- DOS SANTOS, M.A. **Estudos das vias de sinalização mobilizadas pela cepa G de *Trypanosoma cruzi* na invasão celular, da sinalização intracelular ativada pela proteína P21-HIS6 e seu renovelamento.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12385>.
- DOS SANTOS, M.A. *et al.* A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**. v. 4, p. 4259-1-4259-6, 2014. DOI: 10.1038/srep04259.
- DZUTSEV, A. *et al.* Microbes and Cancer. **Annual Review of Immunology**. v. 26, n. 35, p. 199–230, 2017. DOI: 10.1146/annurev-immunol-051116-052133
- GHARAIBEH, R. Z.; JOBIN, C. Microbiota and cancer immunotherapy : in search of microbial signals. **BMJ Journal**. v. 68, n. 3, p. 385–388, 2019. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-317220
- GUO, Q. *et al.* CXCL12-CXCR4 Axis Promotes Proliferation , Migration , Invasion , and Metastasis of Ovarian Cancer. **Oncology Reserach**. v. 22, p. 247–258, 2014. DOI: 10.3727/096504015X14343704124430.

HAASS, N. K. *et al.* Real-time cell cycle imaging during melanoma growth, invasion, and drug response. **Pigment Cell & Melanoma**. v. 27, n.5, p. 764-776. 2014. DOI: 10.1111/pcmr.12274

HAUSCHKA, T., SAXE, L.J., BLAIR, M. *Trypanosoma cruzi* in the treatment of mouse tumors. **J Natl Cancer Inst**, v. 7, p. 189-197, 1947. PMID: 20240431.

HAUSCHKA, T., GOODWIN, M. *Trypanosoma cruzi* Endotoxin (KR) in the Treatment of Malignant Mouse Tumors. **Science**. v. 107, p. 600-602, 1948. DOI: 10.1126/science.107.2788.600.

HIBBS JR, J.B., LAMBERT JR, L.H., REMINGTON, J.S. Resistance to murine tumors conferred by chronic infection with intracellular protozoa, *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. **J Infect Dis**. v. 124, p. 587-92, 1971. DOI: 10.1093/infdis/124.6.587.

HOLLAND, J. D. *et al.* Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. **Cancer Research**. v. 66, n. 8, p. 4117–4124, 2006. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1631.

HUNG, C. *et al.* Cyclophosphamide promotes breast cancer cell migration through CXCR4 and matrix metalloproteinases. **Cell Biology International**. v. 41, n.3, p. 345-352. 2016. DOI: 10.1002/cbin.10726

HWANG, J. H. *et al.* CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 88, n. 1, p. 408–416, 2003. DOI: 10.1210/jc.2002-021381

JIANG, C. *et al.* ScienceDirect AMD3100 combined with triptolide inhibit proliferation , invasion and metastasis and induce apoptosis of human U2OS osteosarcoma cells. **Biomedicine et Pharmacotherapy**. v. 86, p. 677–685, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.12.055.

JOHNSTON, S. T. *et al.* Interpreting scratch assays using pair density dynamics and approximate Bayesian computation. **Open Biology**. v. 4, n. 9, 2014. DOI: 10.1098/rsob.140097.

KAYALI, A. G. *et al.* The stromal cell–derived factor-1 $\alpha$ /CXCR4 ligand–receptor axis is critical for progenitor survival and migration in the pancreas. **Journal of Cell biology**. v. 163, n. 4, p. 859–869, 2003. DOI: 10.1083/jcb.200304153.

KARIN, M. NF- $\kappa$ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v. 1, p. a000141, 2009. DOI: 10.1101/cshperspect.a000141.

KANG, Yun-jeong *et al.* *Trichinella spiralis* infection reduces tumor growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells. **Veterinary Parasitology**. v. 196, n. 1-2, p.106-113, 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.02.021.

KARAR, J, MAITY, A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. **Front Mol Neurosci**. v. 4, n. 51, p. 1-8. 2011. DOI: 103389/fnmol.2011.00051.

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

KREMENTSOV, N., *Trypanosoma cruzi*, cancer and the Cold War. **Hist Cienc Saude Manguinhos**. v. 16, p. 75-94, Jul. 2009. DOI: 10.1590/S0104-59702009000500005

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

KIM, J.O., JUNG, S.S., KIM, S.Y. Inhibition of Lewis lung carcinoma growth by *Toxoplasma gondii* through induction of Th1 immune responses and inhibition of angiogenesis. **J. Korean Med. Sci.** v. 22, S.38, 2007. DOI: 10.3346/jkms.2007.22.S.S38

KLOKER, L. D.; et al. The Oncolytic Herpes Simplex Virus Talimogene Laherparepvec Shows Promising Efficacy in Neuroendocrine Cancer Cell Lines. **Neuroendocrinology**. 2019. DOI: 10.1159/000500159

KRIEG, A. *et al.* CXCR4-A Prognostic and Clinicopathological Biomarker for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Meta-Analysis. **Plos one**. p. 1–17, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0130192

KUCIA, M. *et al.* CXCR4 – SDF-1 signalling , locomotion , chemotaxis and adhesion. **Journal of molecular histology**. v.35, n. 3, p. 233–245, 2004. PMID: 15339043

KÜMPER, S. *et al.* Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis. **Elife**. 2016. DOI: 10.7554/eLife.12203.

LOPEZ, N.C., VALCK, C., RAMIREZ, G., RODRIGUEZ, M., RIBEIRO, C., ORELLANA, J., MALDONADO, I., ALBINI, A., ANACONA, D., LEMUS, D., AGUILAR, L., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, p. e730, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000730

ŁUKASIEWICZ K.; FOL, M. Microorganisms in the Treatment of Cancer : Advantages and Limitations. **Journal of Immunology Research**. v. 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/2397808

LIAO, Y. *et al.* AMD3100 reduces CXCR4-mediated survival and metastasis of osteosarcoma by inhibiting JNK and Akt , but not p38 or Erk1 / 2 , pathways in in vitro and mouse experiments. **Oncology Reports**.p. 33–42, 2015. DOI: 10.3892/or.2015.3992

LIEKENS, S.; SCHOLS, D.; HATSE, S. CXCL12-CXCR4 Axis in Angiogenesis , Metastasis and Stem Cell Mobilization. **Current pharmaceutical design**. v. 16, n. 35, p. 3903–3920, 2010. DOI: 10.2174/138161210794455003

LIN, Y. *et al.* The CXCL12–CXCR4 axis promotes migration, invasiveness, and EMT in human papillary thyroid carcinoma B-CPAP cells via NF- $\kappa$ B signaling. **Biochem Cell Biology**. v. 96, n. 5, p. 619-626, 2018. DOI: 10.1139/bcb-2017-0074.

LIU, T. *et al.* Effectiveness of AMD3100 in treatment of leukemia and solid tumors : from original discovery to use in current clinical practice. **Experimental Hematology & Oncology**.

p. 1–11, 2016. DOI: 10.1186/s40164-016-0050-5

LOMBARDI, L. *et al.* Chemokine receptor CXCR4 : Role in gastrointestinal cancer. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**. v. 88, n. 3, p. 696–705, 2013. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.005.

LOPEZ-HABER, C. *et al.* Heregulin/ErbB3 Signaling Enhances CXCR4-Driven Rac1 Activation and Breast Cancer Cell Motility via Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ . **Molecular and cellular biology**. v. 36, n. 15, p. 2011–2026, 2016. DOI: 10.1128/MCB.00180-16

LV, S. *et al.* The association of CXCR4 expression with prognosis and clinicopathological indicators in colorectal carcinoma patients : a meta-analysis. **Histopathology**. v. 64, n.5, p. 701–712, 2014. DOI: 10.1111/his.12321

MARCHESE, A. *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase AIP4 Mediates Ubiquitination and Sorting of the G Protein-Coupled Receptor CXCR4. **Developmental Cell**. v. 5, n. 5, p. 709–722, 2003. DOI: 10.1016/S1534-5807(03)00321-6

MINEO, J. R.; Normas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: MINEO, J. R.; SILVA D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. (Ed). Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação, Uberlândia: Edufu, p. 81-111, 2005.

MIYAHARA, K., YOKOO, N., SAKURAI, H., IGARASHI, I., SAKATA, Y., YOSHIDA, Y., SAITO, A., HIROSE, T., SUZUKI, N. Antitumor activity of Toxoplasma lysate antigen against methylcholanthrene-induced tumor-bearing rats. **J Vet Med Sci**. v.54, p. 221-8, 1992. DOI: 10.1292/jvms.54.221.

MÖLLER, C. *et al.* Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. **Leukemia**. v. 17, p. 203–210, 2003. DOI: 10.1038/sj.leu.2402717

MO, W. *et al.* CXCR4 / CXCL12 Mediate Autocrine Cell- Cycle Progression in NF1-Associated Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. **Cell**. v. 152, n.5, p. 1077–1090, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.053

MÖHLE, R. *et al.* Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). **Leukemia**. v. 13, n. 12, p. 1954–1959, 1999. PMID: 10602415

MÖHLE, R. *et al.* Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**. v. 110, n. 3, p. 563–572, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2000.02157.x

MUKHERJEE, D.; ZHAO, J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. **American Journal of Cancer Research**. v. 3, n. 1, p. 46–57, 2013. PMID: 23359227

NEEL, N. F. *et al.* Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 16, n.6, p. 637–658, 2005. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.008

NOYA, Verônica et al. Mucin-like peptides from *Echinococcus granulosus* induce antitumor activity. **International Journal Of Oncology**. v. 43, n. 3, p.775-784, 2013. DOI: 10.3892/ijo.2013.2000.

OLIVEIRA, E., LEITE, M., MIRANDA, J., ANDRADE, A., GARCIA, S., LUQUETTI, A., MOREIRA, H. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Carcinogenesis**. v.22, p.737-740, 2001. DOI: 10.1093/carcin/22.5.737

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde Brasil. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5638:10-principais-causas-de-morte-no-mundo&Itemid=0](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5638:10-principais-causas-de-morte-no-mundo&Itemid=0). Acesso em: 21 de Agosto de 2019.

OSINAGA, E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. **IUBMB Life**. v. 59, p. 269-273, 2007. DOI: 10.1080/15216540601188553.

PEHLIVAN, F.S. *et al.* Distribution of CXCR4 and tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes; their relationship with each other, axillary lymph node involvement, and other prognostic indicators. **Polish Journal of Pathology**. v. 69, n. 4, p. 335–341, 2018. 10.5114/pjp.2018.81692.

PERNAS, S. *et al.* Articles Balixafortide plus eribulin in HER2-negative metastatic breast cancer : a phase 1 , single-arm , dose-escalation trial. **Lancet Oncology**. v. 2045, n. 18, p. 1–13, 2018. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30147-5.

PIEROZAN, P.; JERNEREN, F.; KARLSSON, O. Perfluorooctanoic acid ( PFOA ) exposure promotes proliferation , migration and invasion potential in human breast epithelial cells. **Archives of Toxicology**. v. 92, n. 5, p. 1729–1739, 2018. DOI: 10.1007/s00204-018-2181-4.

PLUMELLE, Y., GONIN, C., EDOUARD, A. Effect of *Strongyloides stercoralis* infection and eosinophilia on age at onset and prognosis of adult T-cell leukemia. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 107, p. 81–87, 1997. DOI: 10.1093/ajcp/107.1.81

POLLINO, S. *et al.* CXCR4 in human osteosarcoma malignant progression . The response of osteosarcoma cell lines to the fully human CXCR4 antibody MDX1338. **Journal of Bone Oncology**. v. 17, n. April, p. 100239, 2019. DOI: 10.1016/j.jbo.2019.100239.

RAKHA, E. A., ELLIS, I.O. Modern classification of breast cancer: Should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. **Adv Anat Pathol**. v, 18, n.4, p. 255–267. 2011. DOI: 10.1097/PAP.0b013e318220f5d1.

RAMIREZ, G., VALCK, C., AGUILAR, L., KEMMERLING, U., LOPEZ-MUNOZ, R., CABRERA, G., MORELLO, A., FERREIRA, J., MAYA, J.D., GALANTI, N., FERREIRA, A. Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth. **Mol Immunol**. v. 52, p. 133-140, 2012. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.05.006.

RIBEIRO, R.P. **Produção, purificação e caracterização de anticorpos igy anti-p21 recombinante de Trypanosoma cruzi**. 2016. Dissertação (mestrado em sanidade e produção animal nos trópicos). Universidade de Uberaba, Uberaba, 2016. Disponível em: <https://repositorio.uniube.br/handle/123456789/618?mode=full>.

- RODRIGUES, A. A. *et al.* A Recombinant Protein Based on Trypanosoma cruzi P21 Enhances Phagocytosis. **PLoS ONE**. v. 7, n. 12, p. 1–9, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0051384
- ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual Reviews of Immunology*. v. 18, n. 6, p. 217–242, 2000. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.217
- ROSKIN, G.; EXEMPLIARSKAIA, E. Protozoeninfektion und experimenteller Krebs. I. Mitteilung. **Zeitschrift für Krebsforschung**, Berlin. v 34, n. 1, p.628-645. 1931. DOI: 10.1007/BF01625403.
- SELL, S. Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest? **Environmental Health Perspectives**. v. 101, n. 5, p.15-26, 1993. DOI: 10.1289/ehp.93101s515.
- SCHIOPPA, T. *et al.* Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 198, n. 9, p. 1391-1402. 2003. DOI: 10.1084/jem.20030267
- SCHRADER, A. J. *et al.* CXCR4 / CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. **British Journal of Cancer**. v. 86, n. 8, p. 1250–1256, 2002. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600221.
- SILVA, C.V. *et al.* Characterization of a 21 kDa protein from Trypanosoma cruzi associated with mammalian cell invasion. **Microbes Infection**. v. 11, p. 563–570, 2009. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.03.007
- SILVA, A.A. **Propriedades biológicas das proteínas Galectina-3 e rP21 na infecção por Trypanosoma cruzi in vitro e in vivo**. 2019. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/browse?type=author&value=Silva%2C+Aline+Alves+da>
- SHEKLAKOVA, L., KALLINIKOVA, V., KARPENKO, L. Genetic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* and its direct anticancer effect in cultured human tumor cells. **Bull Exp Biol Med**. v. 135, p. 89-92, 2003. DOI: 10.1023/A:1023466517225
- SO, H. M. *et al.* Bioactivity-based analysis and chemical characterization of cytotoxic compounds from a poisonous mushroom , Amanita spissacea , in human lung cancer cells in vitro. **Natural Product Research**. p. 1–6, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2019.1586699.
- SONG, N. U. R. Y. *et al.* Piceatannol suppresses the metastatic potential of MCF10A human breast epithelial cells harboring mutated H-ras by inhibiting MMP-2 expression. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 32, n. 4, p. 775–784, 2013. DOI: 10.3892/ijmm.2013.
- SOTIRIOU C, PUSZTAI L. Gene-expression signatures in breast cancer. **N Engl J Med**. v, 360, n.8, p. 790–800,2009. DOI: 10.1056/NEJMra0801289.
- STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nature Medicine**. v. 12, n. 8, p. 895–904, 2006. DOI: 10.1038/nm1469
- SU, H. *et al.* Chemokine receptor CXCR4-mediated transformation of mammary epithelial cells by enhancing multiple RTKs expression and deregulation of the p53 / MDM2 axis. **Cancer Letters**. v. 307, n. 2, p. 132–140, 2011. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.03.025.
- TANG, B. *et al.* Clinicopathological Significance of CXCR4 Expression in Renal Cell



Carcinoma : A Meta-Analysis. **Annals of surgical oncology**. v. 22, n. 3, p. 1026–1031, 2015. DOI: 10.1245/s10434-014-4019-5

TEICHER, B. A.; FRICKER, S. P. CXCL12 ( SDF-1 )/ CXCR4 Pathway in Cancer. **Clinical Cancer Research**. v. 16, n. 11, p. 2927–2931, 2010. DOI: 10.1158/1078-0432

TEIXEIRA, S. C. *et al.* Mechanistic Insights into the Anti- angiogenic Activity of Trypanosoma cruzi Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Scientific Reports**. v. 7, p. 44978, 2017. DOI: 10.1038/srep44978

TEIXEIRA, T. L. *et al.* Trypanosoma cruzi P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Scientific reports**. v. 5, p. 16877, 2015. DOI: 10.1038/srep16877.

TORRES, W. *et al.* Bacteria in cancer therapy : beyond immunostimulation. **Journal Cancer Metastasis Treat**. v. 4, n. 4, p. 1-25, 2018. DOI: 10.20517/2394-4722.2017.49

UBILLOS, L. *et al.* Trypanosoma cruzi extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers. **International Journal of Cancer**. v. 138, n. 7, p. 1719–1731, 2016. DOI: 10.1002/ijc.29910

ULLAH, T. R. The role of CXCR4 in Multiple Myeloma: Cells' Journey from Bone Marrow to Beyond. **Journal of Bone Oncology**. v. 17, n. June, p. 100253, 2019. DOI: 10.1016/j.jbo.2019.100253 .

VENKITARAMAN R. Triple-negative / basal-like breast cancer : clinical , pathologic and molecular features. **Expert Review osanticancer therapy**. v. 10, n.2, p. 199–207, 2010. DOI: 10.1586/era.09.189.

VELÁZQUEZ, E.; PEIX, Á.; GÓMEZ-ALONSO, A. Microorganisms and cancer: Scientific evidence and new hypotheses. **Cirugía Española (English Edition)**. v. 89, n. 3, p. 136–144, 2011. DOI:10.1016/S2173-5077(11)70018-7

VODUC, K. D. *et al.* Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. **Journal of clinical oncology**. v. 28, n. 10, p. 1684-1691, 2019. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.9284

WANG, L. *et al.* Osteole Induces Cell Cycle Arrest and Inhibits Migration and Invasion via PTEN / Akt Pathways in Osteosarcoma. **Cell physiology and biochemistry**. v.38, n.6, p. 2173–2182, 2016. DOI: 10.1159/000445573.

WALENKAMP, A. M. E. *et al.* CXCR4 Ligands: The Next Big Hit? **The Journal of Nuclear Medicine**. v.58, p. 77-83, 2017. DOI: 10.2967/jnumed.116.186874

WENG, A. P.; SHAHSAFAEI, A.; DORFMAN, D. M. CXCR4 / CD184 Immunoreactivity in T-Cell Non-Hodgkin Lymphomas With an Overall Th1 – Th2 + Immunophenotype. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 119, n.3, p. 424-430, 2003. DOI: 10.1309/rf4pvcegn2xaf86

WOLCHOK, J. D. *et al.* Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. **NEJM**. V. 377, p. 1345–1356, 2017. DOI: 10.1056/NEJMoa1709684

WU, J.; WU, X.; LIANG, W. Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 overexpression in patients with esophageal cancer: a meta-analysis. **Tumor Biology**. v.35, n.4, p. 3709–3715, 2014. DOI: 10.1007/s13277-013-1490-8

ZENINA, A., KRAVTSOV, E., TSETSEGS AIKHAN, B., YASHINA, N., DALIN, M., KARPENKO, L., SHEKLAKOVA, L., KALLINIKOVA, V. The study of immunological component in antitumor effect of *Trypanosoma cruzi*. **Bull Exp Biol Med**. v. 145, p. 352–354, 2008. DOI: 10.1007/s10517-008-0089-3.

ZHIGUNOVA, A., KRAVTSOV, E., YASHINA, N., DALIN, M., KARPENKO, L. Effects of specific antibodies and immunocompetent cells on tumor growth in passive transfer experiment. **Bull Exp Biol Med**. v. 154, p. 762–764, 2013. DOI: 10.1007/s10517-013-2050-3

ZHANG, X. *et al.* C-Phycocyanin elicited antitumor efficacy via cell- cycle arrest, apoptosis induction, and invasion inhibition in esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Receptors and Signal Transduction**. v. 39, n. 2, p. 114–121, 2019. DOI: 10.1080/10799893.2019.1638400

ZHAO, H.; YAO, Q. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. **Drug Design, Development and Therapy**. v.28, n.9, p. 4953–4964, 2015. DOI: 10.2147/DDDT.S84932

ZHOU, K. X. *et al.* CXCR4 antagonist AMD3100 enhances the response of MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation. **Cancer Letters**. v. 418, p. 196–203, 2018. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.009

ZUO, J. *et al.* Overexpression of CXCR4 promotes invasion and migration of non - small cell lung cancer via EGFR and MMP - 9. **Oncology Letters**. v.14, n. 6, p. 7513–7521, 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.7168.

## 8. Produção científica durante o doutorado

1. COSTA, M. S.; GONCALVES, Y. G.; TEIXEIRA, S. C.; NUNES, D. C. O.; LOPES, D. S.; SILVA, C. V.; SILVA, M. S.; **BORGES, B. C.**; SILVA, M. J. B.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. M.; POELHSITZ, G. V.; YONEYAMA, K. A. G. Increased ROS generation causes apoptosis-like death: Mechanistic insights into the anti-Leishmania activity of a potent ruthenium(II) complex. **JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY**, v. 195, p. 1-12, 2019.

2. SILVA, N. S. L.; **BORGES, B. C.**; Silva, A.A; CASTILHOS, P.; TEIXEIRA, T. L.;

TEIXEIRA, S. C.; Santos, M.A; SERVATO, J. P. S.; JUSTINO, A. B.; CAIXETA, D. C.; TOMIOSSO, T. C.; ESPINDOLA, F. S.; SILVA, C.V. The deleterious impact of interleukin-9 to hepatorenal physiology. *INFLAMMATION*, v. 41, p. 1-10, 2019.

3. TEIXEIRA, SAMUEL COTA; LOPES, DAIANA SILVA; DA SILVA, MARCELO SANTOS; DA LUZ, FELIPE ANDRÉS CORDERO; GIMENES, SARAH NATALIE CIRILO; **BORGES, BRUNA CRISTINA**; DA SILVA, ALINE ALVES; MARTINS, FLÁVIA ALVES; DOS SANTOS, MARLUS ALVES; TEIXEIRA, THAISE LARA; OLIVEIRA, RICARDO A. OLIVEIRA; ÁVILA, VERIDIANA DE MELO RODRIGUES; SILVA, MARCELO JOSÉ BARBOSA; ELIAS, MARIA CAROLINA; MARTIN, RENÉ; DA SILVA, CLAUDIO VIEIRA; KNÖLKER, HANS-JOACHIM. Pentachloropseudilin Impairs Angiogenesis by Disrupting Actin Cytoskeleton, Integrin Trafficking and Cell Cycle. *CHEMBIOCHEM*, v. 1, p. 1, 2019.

4. TEIXEIRA, THAISE L.; CASTILHOS, PATRÍCIA; RODRIGUES, CASSIANO C.; DA SILVA, ALINE A.; BRÍGIDO, REBECCA T. S.; TEIXEIRA, SAMUEL C.; **BORGES, BRUNA C.**; DOS SANTOS, MARLUS A.; MARTINS, FLÁVIA A.; SANTOS, PAULO CÉSAR F.; SERVATO, JOÃO PAULO S.; SILVA, M.S.; DA SILVA, M.J.B.; ELIAS, M.C.; DA SILVA, CLAUDIO V. Experimental evidences that P21 protein controls Trypanosoma cruzi replication and modulates the pathogenesis of infection. *MICROBIAL PATHOGENESIS*, v. 1, p. 103618, 2019.

5. FURTADO, FABIANA; **BORGES, BRUNA**; TEIXEIRA, THAISE; GARCES, HANS; ALMEIDA JUNIOR, LUIZ; ALVES, FERNANDA; SILVA, CLAUDIO; FERNANDES JUNIOR, ARY. Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oil from Blepharocalyx salicifolius. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, v. 19, p. 33, 2018.

6. SILVA, MAKSWELL ALMEIDA; LOPES, DAIANA SILVA; TEIXEIRA, SAMUEL COTA; GIMENES, SARAH NATALIE CIRILO; VAN PETTEN VASCONCELOS AZEVEDO, FERNANDA; POLLONI, LORENA; **BORGES, BRUNA CRISTINA**; DA SILVA, MARCELO SANTOS; BARBOSA, MARCELO JOSÉ; DE OLIVEIRA JÚNIOR, ROBSON JOSÉ; ELIAS, MARIA CAROLINA; DA SILVA, CLAUDIO VIEIRA; YONEYAMA, KELLY APARECIDA GERALDO; DE MELO RODRIGUES, VERIDIANA; RODRIGUES, RENATA SANTOS. Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) homologue from Bothrops pauloensis snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer

cells. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, v. 18, p. S0141, 2018.

8. RODRIGUES, ADELE A.; NOTÁRIO, ANA FLÁVIA O.; TEIXEIRA, THAISE L.; SILVA, REBECCA T. E; QUINTAL, AMANDA P. N.; ALVES, ROSIANE N.; BRÍGIDO, PAULA C.; SIQUEIRA, CARLA S.; MARTINS, FLÁVIA A.; MACHADO, FABRÍCIO C.; CLEMENTE, TATIANA M.; SILVA, ALINE A. DA; **BORGES, BRUNA C.**; TEIXEIRA, SAMUEL C.; SANTOS, MARLUS A. DOS; SILVA, CLAUDIO V. DA. A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of Trypanosoma cruzi experimental oral infection. Acta Tropica, v. 157, p. 42-53, 2016.

9. **BORGES, BRUNA C.**; UEHARA, ISADORA A.; DIAS, LAYSA O. S.; BRÍGIDO, PAULA C.; DA SILVA, CLAUDIO V.; SILVA, MARCELO J. B. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by Trypanosoma cruzi. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 6, p. 161, 2016.

10. QUINTAL, AMANDA P. N.; **BORGES, BRUNA C.**; BRÍGIDO, PAULA C.; SILVA, REBECCA T.; NOTÁRIO, ANA F.; SANTOS, MARLUS A.; DE SOUZA, MARIA A.; NASCIMENTO, FERNANDA G. O.; MUNDIM, ANTÔNIO V.; COSTA, GUILHERME M. J.; VASCONCELOS, ANDRÉ B.; DA SILVA, CLAUDIO V. Revealing the kinetics of Leishmania chagasi infection in the male genital system of hamsters. INFECT DIS POVERTY, v. 5, p. 29, 2016.

11. TEIXEIRA, THAISE LARA; MACHADO, FABRÍCIO CASTRO; ALVES DA SILVA, ALINE; TEIXEIRA, SAMUEL COTA; **BORGES, BRUNA CRISTINA**; DOS SANTOS, MARLUS ALVES; MARTINS, FLÁVIA ALVES; BRÍGIDO, PAULA CRISTINA; RODRIGUES, ADELE AUD; NOTÁRIO, ANA FLÁVIA OLIVEIRA; FERREIRA, BRUNO ANTÔNIO; SERVATO, JOÃO PAULO SILVA; DECONTE, SIMONE RAMOS; LOPES, DAIANA SILVA; ÁVILA, VERIDIANA MELO RODRIGUES; ARAÚJO, FERNANDA DE ASSIS; TOMIOSSO, TATIANA CARLA; SILVA, MARCELO JOSÉ BARBOSA; DA SILVA, CLAUDIO VIEIRA. Trypanosoma cruzi P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. Scientific Reports, v. 5, p. 16877, 2015.