

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAYANE CRISTINA DE OLIVEIRA

Estudo da infecção por *Trypanosoma cruzi* em células normais e tumorais de mama

Uberlândia-MG
2021

RAYANE CRISTINA DE OLIVEIRA

Estudo da infecção por *Trypanosoma cruzi* em células normais e tumorais de mama

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência para a obtenção ao título de licenciada e bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

**Uberlândia-MG
2021**

RAYANE CRISTINA DE OLIVEIRA

Estudo da infecção por *Trypanosoma cruzi* em células normais e tumorais de mama

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência para a obtenção ao título de licenciado em Ciências Biológicas.

Uberlândia, 18 de outubro de 2021.

Banca examinadora:

Bruna Cristina Borges

Samuel Cota Teixeira

**Uberlândia-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado e dado forças durante a minha trajetória na graduação.

Aos meus pais, Paulo e Tania, por sempre terem apoiado meus estudos. Sem eles eu não teria ingressado na faculdade e persistido em busca da minha formação acadêmica. Sou grata por serem meu porto seguro, amo muito vocês!!

Ao meu orientador, Claudio Vieira da Silva, por ter me acolhido no laboratório e por proporcionar aprendizados e experiências incríveis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico pela bolsa de Iniciação Científica (Edital N° 03/2021 PIBIC CNPq/UFU).

Aos membros do Laboratório de Tripanosomatídeos-LATRI (Marlus, Mylla, Thaíse, Júlia, Isabella, Samuel, Cassiano e Ana Clara) por todo aprendizado e convivência.

À Isabella, minha dupla de laboratório, por sempre me acompanhar nos experimentos, pelos momentos marcantes que tivemos ao longo do curso e, principalmente, pela amizade construída em virtude do nosso estágio.

Aos meus amigos pelo suporte emocional e por tornarem a graduação um lugar aconchegante (Alexia, César, Juliene, Maria Thereza, Milena, Rafaela e Taynara).

Às minhas amigas da vida (Laura e Larissa) que foram minhas psicólogas ao longo da minha faculdade. Que sempre me motivaram a dar o melhor.

Ao meu namorado, Douglas, que me apoiou no desenvolvimento deste projeto e que sempre esteve comigo em todos os momentos.

Por fim, agradeço imensamente a Bruna e o Samuel por terem aceitado gentilmente o convite para compor a banca.

RESUMO

Entre as mulheres o câncer de mama é a neoplasia mais comum e com maior taxa de mortalidade. O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) é um subtipo de tumor caracterizado pela ausência de receptores e consequente falta de tratamentos. A maioria das mortes causadas por câncer de mama não se deve ao sítio primário do tumor, mas sim à formação de metástases em outros órgãos. Portanto, quimiocinas e receptores têm papel crucial neste quadro clínico, uma vez que regulam a migração de células tumorais. Assim, várias moléculas alvo são estudadas, dentre elas estão o receptor de quimiocina CXCR4 e seu ligante CXCL12. Nesse contexto, a proteína P21 secretada pelo *Trypanosoma cruzi* desempenha um papel fundamental na regulação do eixo CXCR4/CXCL12. Recentemente, sabe-se que a rP21 liga-se ao receptor CXCR4 nas células MCF-10A (células não tumorais) e MDA-MB-231 (células de câncer de mama triplo-negativas), interferindo nos fenótipos de migração/invasão e proliferação dessas células. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a invasão e multiplicação celular do *T. cruzi* em células normais e tumorais de mama humanas e a migração celular de ambas as linhagens celulares infectadas por *T. cruzi*. Nossos dados mostraram que as células MDA-MB-231 possuem maior taxa de invasão por *T. cruzi* e que o parasita se replica mais nas células MCF-10A. Com isso ambas as células apresentaram ser suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, sendo que a MDA-MB-231 por ter maior liberação de formas amastigotas no sobrenadante e menor formação de ninhos apresentou ser mais suscetível à infecção. Além disso, demonstramos que o *T. cruzi* reduz significativamente a migração celular de ambas as linhagens celulares de ligando ao receptor CXCR4. Logo, assim como a rP21, *T. cruzi* apresenta características antitumorais atuando como antagonista do principal ligante do receptor CXCR4.

Palavras chaves: *T. cruzi*, CXCR4, invasão celular, MDA-MB-231, MCF-10A e TNBC.

ABSTRACT

Among women, breast cancer is the most common neoplasm and has the highest mortality rate. Triple-negative breast cancer (TNBC) is a tumor subtype characterized by the absence of receptors and consequent lack of treatments.. Most deaths caused by breast cancer are not due to the primary site of the tumor, but to the formation of metastases in other organs. Therefore, chemokines and receptors play a crucial role in this clinical picture, as they regulate the migration of tumor cells. Thus, several target molecules are studied, among them is the chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12. In this context, the P21 protein secreted by *Trypanosoma cruzi* plays a fundamental role in the regulation of the CXCR4/CXCL12 axis. Recently, rP21 is known to bind to the CXCR4 receptor on MCF-10A cells (non-tumor cells) and MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer cells), interfering with migration/invasion phenotypes and proliferation of these cells. Thus, this study aimed to evaluate the cellular invasion and multiplication of *T. cruzi* in normal and human breast tumor cells and the cell migration of both cell lines infected by *T. cruzi*. Our data showed that MDA-MB-231 cells have a higher rate of invasion by *T. cruzi* and that the parasite replicates more in MCF-10A cells. Thus, both cells were found to be susceptible to infection by *T. cruzi*, and MDA-MB-231, due to its greater release of amastigote forms in the supernatant, and less formation of nests, was more susceptible to infection. Furthermore, we demonstrated that *T. cruzi* significantly reduces cell migration of both cell lines from ligand to the CXCR4 receptor. Therefore, like rP21, *T. cruzi* has antitumor characteristics acting as an antagonist of the main ligand of the CXCR4 receptor.

Key words: *T. cruzi*, CXCR4, cell invasion, MDA-MB-231, MCF-10A and TNBC.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	8
1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.2	Doença de Chagas.....	9
1.3	Câncer de mama Triplo-Negativo.....	10
1.4	<i>Trypanosoma cruzi</i> e Câncer.....	13
2.	Objetivos.....	15
3.	Metodologia.....	16
3.1	Local de estudo.....	16
3.2	Células e parasitas.....	16
3.3	Ensaio de Invasão.....	16
3.4	Ensaio de Multiplicação.....	17
3.5	Ensaio de Replicação.....	17
3.6	Ensaio de Migração Vertical.....	17
3.7	Microscopia Confocal.....	18
3.8	Análise Estatística.....	18
4	Resultados e Discussão.....	20
4.1	<i>T. cruzi</i> invade mais MDA-MB-231 do que MCF-10A.....	20
4.2	Linhagem MCF-10A apresenta maior taxa de replicação.....	21
4.3	<i>T. cruzi</i> está diretamente envolvido no processo migração celular.....	24
4.4	<i>T. cruzi</i> interage com o receptor CXCR4	26
5	Conclusão.....	31
6	Referências.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae. É o agente etiológico da Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, que foi descoberta por Carlos Chagas em 1909 na cidade de Lassance no estado de Minas Gerais (D'AVILA; TOLEDO; MELO, 2012; TODOROV et al., 2000).

T. cruzi apresenta um ciclo biológico heteroxênico complexo, apresentando formas de desenvolvimento em hospedeiros invertebrados, os vetores da doença, representado por insetos hemípteros dos gêneros *Triatoma* spp., *Rhodnius*, e *Panstrongylus* spp. pertencentes à família Reduviidae; e em hospedeiros vertebrados mamíferos, principalmente humanos (BARRETO, 1979). O ciclo abrange três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota; o processo de desenvolvimento de um estágio a outro é complexo, pois envolve mudanças ultraestruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973). O estágio não infectivo é representado pela forma epimastigota, encontrada no intestino do triatomíneo, onde se multiplica. Os estágios infectivos são representados pelas formas tripomastigotas e amastigotas. Os tripomastigotas metacíclicos são derivadas de epimastigota e são encontrados no inseto vetor. Já os tripomastigotas sanguíneos são derivados de amastigotas e são encontrados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Por fim, as formas amastigotas, consideradas formas replicativas, são encontradas no interior das células do hospedeiro vertebrado, onde se multiplicam (DIAS; NETO; LUNA, 2011; SALASSA; ROMANO, 2019).

A forma vetorial clássica de transmissão inicia-se quando os tripomastigotas metacíclicos, presentes nas fezes do vetor, entra em contato com o sangue periférico por meio da lesão cutânea causada pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo e infectam células mononucleares, como os monócitos. Nas células mononucleares, a forma tripomastigota metacíclica se diferencia em amastigota, que passam por inúmeras divisões celulares até se transformar em tripomastigota derivado de células. Esta última forma é responsável pela lise celular e, conseqüentemente, migração para infectar outras

células ou tecidos para os quais tem um alto tropismo (CRUZ-SAAVEDRA et al., 2020; KM; DM, 2001).

Além da forma vetorial clássica o parasita pode ser transmitido congenitamente, por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e por via oral (DIAS; NETO; LUNA, 2011).

1.2 Doença de Chagas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a doença de Chagas é reconhecida como uma doença tropical negligenciada que representa um grave problema de saúde pública e econômico para a humanidade, com aproximadamente oito milhões de pessoas infectadas (ARAÚJO et al., 2009; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012; PEREIRA; NAVARRO, 2013). A doença de Chagas apresenta uma sintomatologia variada com duas fases distintas: a fase inicial aguda e uma fase crônica (LOZANO, 2011).

Na fase aguda os pacientes podem apresentar quadro clínico sintomático ou assintomático, sendo que a maior parte não apresenta nenhum sintoma. Nos pacientes sintomáticos os sintomas duram cerca de dois dias a quatro meses, podendo ocorrer erupções epiteliais, nódulos inflamatórios, febre, dor de cabeça, náuseas, diarreia, vômito, dificuldade para respirar e gânglios linfáticos aumentados (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Já na fase crônica, os parasitas estão principalmente no coração e no trato digestivo, onde 30% dos pacientes desenvolvem distúrbios cardíacos e até 10% sofrem de alterações digestivas, incluindo dilatação do trato gastrointestinal, principalmente esôfago e cólon (reto e sigmoide), alterações neurológicas ou mistas. A infecção crônica pode levar à morte súbita devido a cardiomiopatia dilatada, fenômenos tromboembólicos, arritmias e insuficiência cardíaca progressiva causada pela destruição do músculo cardíaco.

Entre 2001 e 2018, foram notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) mantido pelo Ministério da Saúde do Brasil 5.184 casos de Doença de Chagas Aguda. Foi notificado pelo menos um caso crônico da doença em 307 de 558 (55,0%) microrregiões, o que corresponde a 3.238 municípios e uma população total de 158.363.480 habitantes (76,3% da população brasileira). A taxa anual de casos notificados no Brasil entre 2001 e 2018 foi de 0,16 por 100.000 habitantes / ano, variando de 0,07 a 0,32 casos notificados por 100.000 habitantes (SANTOS et al., 2020).

No Brasil, a Doença de Chagas persiste como relevante problema de saúde pública, como evidenciado pela ocorrência de casos agudos em mais de 50% das microrregiões brasileiras (JC et al., 2016; SANTOS et al., 2020). A cura da doença de Chagas prossegue parcialmente ineficaz, não há atualmente um tipo de vacina disponível, as drogas utilizadas no tratamento apresentam efeitos colaterais indesejáveis e nenhuma consegue eliminar o parasita e promover uma cura definitiva (SMULSKI et al., 2010).

1.3 Câncer de mama Triplo-Negativo

O câncer é uma doença que apresenta crescimento celular desordenado e crescente de células com alguma falha no controle de mitose (SELL, 1993). O câncer de mama (CM) é a doença maligna invasiva mais predominante e a causa mais comum de morte relacionada ao câncer em mulheres em todo o mundo (BRAY et al., 2018). Anualmente mais de 2,1 milhões de mulheres são diagnosticadas e mais de 650.000 morrem em consequência dessa doença a cada ano (VAFAIZADEH et al., 2020). Para o ano de 2021 foram estimados 66.280 casos novos de câncer de mama o que representa uma taxa ajustada de incidência de 43,74 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2019a), sendo que a taxa de mortalidade, ajustada pela população mundial, foi de 14,23 óbitos/100.000 mulheres, em 2019 (INCA, 2021).

O CM é classificado molecularmente em três grupos principais: câncer de mama Luminal (positivo para receptores hormonais); HER2 superexpresso e triplo-negativo. Essa divisão se relaciona diretamente com o tratamento tumoral e, conseqüentemente, com o prognóstico do paciente (SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009; RAKHA; ELLIS, 2011).

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) é um subtipo de tumor caracterizado pela ausência de expressão de receptores hormonais, como os receptores de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (Zhou et al., 2018). Entre os subtipos de câncer de mama, o HER2 é o mais frequente, seguido por TNBC com uma taxa ajustada por idade de 85,8 e 13 novos casos por 100.000 mulheres, respectivamente (“Câncer de mama feminino - Fatos sobre estatísticas de câncer”, [s.d.]).

O TNBC, que geralmente é responsável por 5% a 20% de todos os tipos de tumores de mama humanos, possui alta capacidade de crescimento e disseminação, está associado a mau prognóstico, possui comportamento clínico agressivo e desenvolvimento precoce de recorrência (LIU et al., 2018; DIETZE et al., 2015; BOLLINGER, 2018; EA et al.,

2007). O mau prognóstico envolve um padrão metastático distinto envolvendo linfonodos regionais, medula óssea, pulmões e fígado (Müller et al., 2001). Como o TNBC apresenta tratamentos ineficazes, devido à falta de alvos terapêuticos específicos para esse tipo de tumor, a quimioterapia citotóxica convencional permanece como opção de tratamento primária, o que resulta em um quadro clínico insatisfatório (VENKITARAMAN, 2010).

Dada a ausência de terapias direcionadas específicas, os tumores TNBC apresentam evolução clínica desfavorável (LEBERT et al., 2018). A maioria das mortes causadas por CM não se deve ao sítio primário do tumor, mas sim à formação de metástases em outros órgãos do corpo (WEIGELT et al., 2005). Notavelmente, em comparação com outros subtipos, no TNBC as células têm um programa de transição epitelial-mesenquimal (EMT) ativado, um processo altamente dinâmico por quais células epiteliais bem polarizadas são convertidas em células mesenquimais não polarizadas, incluindo alterações na adesão célula-célula e célula-matriz, remodelação do citoesqueleto de actina e perda de polaridades, juntamente com mobilidade celular e invasividade, maior potencial metastático e resistência a terapias eficazes (THIERY et al., 2009; SARRIÓ et al., 2008; DONG et al., 2013; MANI et al., 2008)

Quimioterapia e radioterapia convencionais têm efeitos colaterais adversos e geralmente são falhos resultando em maiores taxas de recorrência (Gelmon et al., 2012; LEE; DJAMGOZ, 2018). Logo, a necessidade clínica do TNBC continua a ser um grande desafio, e a compreensão dos mecanismos moleculares na biologia e patogênese do TNBC pode auxiliar na identificação de novas estratégias para a prevenção do câncer e o desenvolvimento de um tratamento eficiente. Quimiocinas e seus receptores possuem papel crucial nesse quadro clínico, uma vez que regulam a migração de células tumorais e metástases. Assim, várias moléculas alvo são estudadas, dentre elas está o receptor de quimiocina CXCR4 (CHEN et al., 2019; ZHOU et al., 2018).

O receptor de quimiocina CXCR4 é um membro da superfamília do receptor acoplado à proteína G (GPCR) (COJOC et al., 2013). Este receptor é expresso constitutivamente em uma ampla variedade de tecidos normais e órgãos, como o tecido linfático, timo, cérebro, baço estômago e intestino delgado. Ademais, é expresso também em vários tipos de células tumorais (BALKWILL, 2004).

As quimiocinas são um grupo de citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular secretadas por uma variedade celular, como células-tronco, células B, células

T, linfócitos inatos, células mieloides, células dendríticas e células do estroma (HUGHES; NIBBS, 2018). As quimiocinas e seus receptores possuem diversas funções biológicas multifacetadas, como a quimiotaxia, migração de leucócitos e inflamação (LOPEZ, 2017). Consequentemente, estão invariavelmente associados a muitas doenças humanas, como câncer e doenças inflamatórias (CHENG et al., 2019).

CXCL12 (também conhecida como SDF-1a) é uma quimiocina e o principal ligante do CXCR4. A ligação entre CXCL12 e CXCR4 regula várias vias que estão envolvidas com alteração do citoesqueleto de actina, migração e sobrevivência celular (COJOC et al., 2013; LIEKENS et al., 2010). Além dessas funções, tal eixo pode promover a metástase do tumor mediando a invasão e proliferação celular e também aumentando a formação de novos vasos sanguíneos associados ao tumor (COJOC et al., 2013).

Para otimizar o aumento do crescimento tumoral e metástase, as células cancerígenas aumentam a expressão de CXCR4 e a síntese de CXCL12 (LIEKENS et al., 2010). As células CXCR4-positivas são conduzidas pelo gradiente de concentração CXCL12. Sendo assim, células tumorais deixam o sítio primário em direção aos órgãos que expressam mais CXCL12, dando origem a metástases (TEICHER e FRICKER, 2010). A superexpressão do CXCR4 promove migração, adesão e invasão das células tumorais, além de promover a transição epitélio-mesênquima e atuar no desenvolvimento do tumor (LIU et al., 2016).

Em um dos trabalhos desenvolvidos por nosso grupo foi demonstrado que células de câncer de mama triplo-negativas (MDA-MB-231) apresentam maior expressão de CXCR4 quando comparadas com células de mama não tumorais (MCF-10A). Ademais, no mesmo trabalho foi demonstrado que a rP21 é capaz de se ligar às membranas celulares da MCF-10A e da MDA-MB-231, bloquear o ciclo celular, interrompendo-o na fase G1, principalmente nas células MDA-MB-231, prevenir a quimiotaxia e proliferação induzida por CXCL12, diminuir a expressão do gene CXCR4 e diminuir os receptores no citoplasma das células MDA-MB-231, sugerindo internalização de CXCR4 (BORGES et al., 2020).

A P21 é uma proteína secretada exclusivamente pelo *T. cruzi* que apresenta diversas atividades. Estudos com a P21 recombinante (rP21) demonstraram aumento na fagocitose, na polimerização do citoesqueleto de actina de macrófagos murinos e indução da quimiotaxia de leucócitos (TEIXEIRA et al., 2019)

1.4 *Trypanossoma cruzi* e Câncer

A ideia de usar uma doença para curar outra tem uma história muito longa, e os relatos de tentativas de usar infecções agudas para curar tumores malignos datam da década de 1880. A malarioterapia, utilização do parasita *Plasmodium* para estimular o sistema imune do organismo a combater a malária, foi um dos fatores que inspirou Roskin a pesquisar entre outros protozoários, como os tripanossomos, uma ferramenta biológica contra o câncer (KREMENTSOV, 2009). Uma vez que a malarioterapia combateu não só a infecção causada pelo próprio parasita, mas também a sífilis terciária (JULIUS WAGNER-JAUREGG, 1938). Desde então, cientistas procuram compreender tais mecanismos que podem contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos contra o câncer. Microorganismos e especialmente vírus podem desempenhar papel importante para a iniciação e progressão do câncer (WHISNER; AKTIPIS, 2019). Por outro lado, vários estudos envolvendo parasitas demonstram que moléculas bioativas e parasitas promovem efeitos antitumorais, como *Strongyloides stercoralis*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* e *Trypanosoma cruzi* (PLUMELLE et al., 1997; KIM et al., 2007 ; CHEN et al., 2011).

Moléculas do parasita podem desempenhar atividades anticâncer (ATAYDE et al., 2008 ; VALCK et al., 2010 ; DARANI; YOUSEFI, 2012 ; RAMÍREZ et al., 2012), indução da imunidade antitumoral, imunomodulação (UBILLOS et al., 2016; MOHAMADI et al., 2019; RIAZ, 2019) e regulação gênica (Lu et al., 2019). Trabalhos que utilizaram diferentes cepas de *T. cruzi* para tratamento do carcinoma demonstraram correlação entre parasitemia alta e diminuição do desenvolvimento tumoral em modelos animais e que os extratos do parasita tiveram o mesmo efeito (KREMENTSOV, 2009). Logo, a resposta imunológica desencadeada por *T. cruzi* poderia ser eficiente contra células tumorais em virtude do mimetismo molecular de antígenos (ZHIGUNOVA et al., 2013 ; UBILLOS et al., 2016). Ademais, é descrito na literatura que *T. cruzi* possui atividade pró-apoptótica em células tumorais (Mucci et al., 2006) e proteínas de membrana antitumorais, como GP82 e proteína calreticulina (Atayde et al., 2008; Valck et al., 2010; Ramirez et al., 2012).

A forma recombinante da P21 atua como indutor de fagocitose, ligando-se ao receptor de quimiocina CXCR4 e ativando a polimerização da actina em macrófagos (RODRIGUES et al., 2012). Além disso, evidências do nosso laboratório demonstraram

que a rP21 se liga aos receptores CXCR4 nas células MCF-10A e MDA-MB-231, interferindo nos fenótipos de migração / invasão e proliferação dessas células (BORGES et al., 2020). O tratamento com diferentes concentrações de rP21 inibi a formação de vasos na linhagem celular endotelial murina (tEnd) após 18 horas de incubação (TEIXEIRA et al., 2015). Sendo que a atividade antiangiogênica da rP21 é dependente do tempo, que foi observada em 24, 48 e 72 horas (TEIXEIRA et al., 2017). Já é descrito que o bloqueio da via de sinalização CXCR4 e o tratamento subsequente com ou sem rP21 não inibiu a formação de vasos. Logo, a atividade antiangiogênica de rP21 depende de sua interação com CXCR4 (TEIXEIRA et al., 2017).

Desta forma, é interessante considerar o papel do próprio parasita no microambiente tumoral do câncer de mama triplo-negativo. Acreditamos que o *T. cruzi* possa atuar como uma molécula antagonista do principal ligante do receptor CXCR4, a quimiocina CXCL12. Para tanto, observamos a invasão e multiplicação intracelular de *T. cruzi* em células tumorais e não tumorais, a cinética de recrutamento de CXCR4 em torno do parasita ao longo do processo de invasão celular em ambos os tipos celulares e a migração celular de ambas as linhagens infectadas por *T. cruzi*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o comportamento biológico de células epiteliais normais ou tumorais de mama frente à infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a invasão celular de *T. cruzi* em células normais e tumorais de mama *in vitro*
- Quantificar a multiplicação intracelular de *T. cruzi* em células normais e tumorais de mama.
- Avaliar a migração celular de ambas as linhagens as células infectadas por *T. cruzi*.
- Avaliar a taxa de replicação do parasito em ambas as células
- Verificar a participação do receptor CXCR4 na infecção por *T. cruzi* em ambas as linhagens celulares, em diferentes tempos.

3. METODOLOGIA

3.1 Local de estudo

Os procedimentos experimentais foram conduzidos no Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), localizado no campus Umuarama (Bloco 2B, sala 200), no Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O LATRI apresenta dimensões adequadas às características do projeto apresentado e contém os equipamentos básicos para o desenvolvimento deste projeto.

3.2 Células e parasitas

Para execução deste estudo trabalhamos com três tipos celulares distintos: fibroblastos de rim de macaco verde da África (Vero), linhagem tumoral metastática triplo negativa de mama humana (MDA-MB-231) e linhagem epitelial não transformada de mama humana (MCF-10A). As células Vero e a MDA-MB-231, foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium - Vitrocell/Embriolife), com L-glutamina (2mM) e D-glicose (4500 mg/L), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), HEPES (2380 mg/L), piruvato de sódio (1100 mg/L), suplementado com os antibióticos penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L), estreptomicina (10 mg/L) e soro fetal bovino (SFB - Vitrocell/Embriolife) a 10%. A MCF-10A foi 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), 5% de SFB, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (BORGES et al., 2020). Células mamárias humanas não tumorigênicas (MCF-10A) e células tumorais humanas triplonegativas (MDA-MB-231) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro.

Tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) de *T. cruzi* (cepa Y) foram as formas de desenvolvimento usadas neste estudo. TCT foram coletados no sobrenadante de células Vero previamente infectadas, cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² contendo 5 ml de meio DMEM com 2,5% de SFB até ocorrer a eclosão dos parasitas.

As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂, sendo avaliadas diariamente e o meio substituído sempre que necessário.

3.3 Ensaio de Invasão

As células (MCF-10A e MDA-MB-231) foram semeadas em placas de 24 poços (1x10⁵ células/poço), contendo lamínulas circulares de 13mm. As células foram

incubadas *overnight* para aderirem às lamínulas. No dia seguinte foram desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (10 parasitos por célula). Após 2 horas de invasão, os poços foram lavados com solução salina tamponada com tampão fosfato (PBS), para a eliminação daqueles parasitos que não foram internalizados. As lamínulas foram fixadas com *Bouin* por 15 min (composta por 71,4% de ácido pícrico, 23,8% de formaldeído na concentração de 37,5% e 4,8% de ácido acético) e coradas com *Giemsa* por 35 minutos. As lamínulas foram então descoradas em concentrações decrescentes de acetona e crescentes de xilol, e posteriormente coladas em lâminas de vidro com uso de *Entelan*. Para a avaliação da invasão celular contamos o número de células infectadas em 300 células totais e o número de formas amastigotas nessas 300 células totais. Para tanto, foi utilizada aumento de 100x do microscópio de luz com óleo de imersão.

3.4 Ensaio de Multiplicação

As células (MCF-10A e MDA-MB-231) foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/poço), contendo lamínulas circulares de 13mm. As células foram incubadas *overnight* para aderirem às lamínulas. No dia seguinte foram desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (10 parasitos por célula). Após 2 horas de invasão, os poços foram lavados com solução salina tamponada com tampão fosfato (PBS), para a eliminação daqueles parasitos que não foram internalizados. Em seguida a placa foi reservada na estufa por 72 horas para análise da multiplicação do parasita. Dado o tempo, as lamínulas foram fixadas com *Bouin* por 15 min (composta por 71,4% de ácido pícrico, 23,8% de formaldeído na concentração de 37,5% e 4,8% de ácido acético) e coradas com *Giemsa* por 35 minutos. As lamínulas foram então descoradas em concentrações decrescentes de acetona e crescentes de xilol, e posteriormente coladas em lâminas de vidro com uso de *Entelan*. Para a avaliação da multiplicação contamos o número de formas amastigotas em 100 células infectadas. Para tanto, foi utilizado aumento de 100x do microscópio de luz com óleo de imersão.

3.5 Contagem de tripomastigotas no sobrenadante

Para avaliar a taxa de liberação de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, as células (MCF-10A e MDA-MB-231) foram semeadas em placas de 24 poços (7×10^4 células/poço). As células foram incubadas *overnight* para aderirem à placa. No dia seguinte foram desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (10 parasitos por célula). O número de tripomastigotas liberados nos sobrenadantes foi avaliado por 9 dias, em câmara de Neubauer, todo dia após o segundo dia de infecção.

3.6 Ensaio de Migração Vertical

Para avaliar a migração celular utilizamos *transwells* com poros de 8 µm (Costar, Corning, Estados Unidos da América). A câmara superior continha MCF-10A e MDA-MB-231 no meio de cultura sem SFB (1×10^5 /ml) e a câmara inferior continha o meio de cultura sem SFB com 20 ng/ml CXCL12 (quimioatraente). Células foram infectadas 1h antes com *T. cruzi* (10:1) e em seguida adicionadas na câmara superior. As células foram incubadas por 6 h a 37°C em 5% CO₂. As células não migradas foram retiradas da superfície superior da membrana com um cotonete e as células migradas que permaneceram na superfície inferior foram contadas após a coloração com o Kit Corante Rápido Panótico (Newprov, Brasil). A contagem de células foi feita usando um microscópio Leica DM 500 com aumento de 10x. As imagens foram usadas para contar o número de células que migraram em 10 campos usando o *software ImageJ*.

3.7 Microscopia Confocal

Para determinar a interação do *T. cruzi* com CXCR4 de células não tumorais e células de câncer de mama triplo-negativas, células (MCF-10A e MDA-MB-231) foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/poço), contendo lamínulas circulares de 13mm. Em seguida, as células foram desafiadas com TCTY, na proporção de 20:1 (20 parasitos por célula) durante duas horas. Depois, as células foram lavadas com PBS e fixadas em diferentes momentos (3, 6, 9 e 12 horas pós-infecção). As células foram fixadas com formaldeído a 4% por 1 hora e lavadas três vezes com PBS. Em seguida, foram permeabilizados e bloqueados com PGN saponina (0,15% de gelatina, 0,1% de azida de sódio e 1% de saponina) e marcados com anticorpos primários anti-CXCR4 (Sigma, Estados Unidos, diluído 1:100) e soro chagásico humano (diluído 1:500) durante a noite a 4 ° C. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS, incubadas com anticorpos secundários Alexa Fluor 568 anti-coelho (diluído 1:200), Alexa Fluor 488 anti-humano (diluído 1:200) e TO-PRO-3 (coloração nuclear, diluído 1:200). Após as lavagens, as lâminas foram montadas em PPD e analisadas por microscopia confocal. As imagens foram obtidas em um microscópio Zeiss LSM 510 META com aumento de 63 ×.

3.8 Análise Estatística

Primeiramente todos os dados foram verificados quanto à distribuição normal. E em seguida os ensaios quantitativos foram comparados por meio de análise de variância simples (One way ANOVA), análise de variância de dupla classificação com erro padrão (Two way ANOVA), comparações múltiplas de Tukey teste e teste t de Student para

dados paramétricos ou o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos de acordo com o desenho experimental. Todos os testes foram expressos com um nível de confiança de 95%, sendo os resultados obtidos através do software GraphPad Prism®, versão 8.0, considerando significativo $p < 0,05$. Os experimentos foram realizados em triplicata de pelo menos três experimentos independentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *T. cruzi* invade mais MDA-MB-231 do que MCF-10A

Para a avaliação da invasão celular realizamos a contagem do número de células infectadas em 300 células totais e contamos o número de parasitas internalizados nessas 300 células totais. Observamos, como demonstra a Figura 1, uma maior taxa de invasão na linhagem celular tumoral, uma vez que a MDA-MB-231 apresentou maior número de células infectadas quando comparada com a MCF-10A. As Figuras 1C e 1D são a representação qualitativa desse resultado.

É descrito que macrófagos são altamente suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, apesar de controlarem uma infecção na proporção 1:1 (parasita por célula) eles são destruídos na proporção de 10: 1 (TANOWITZ et al., 1975). Da mesma forma, a infecção por *T. cruzi* em astrócitos aumenta em 3,5 vezes a mortalidade em comparação com o grupo de células não infectadas. Por outro lado, trofoblastos da placenta humana têm susceptibilidade reduzida à infecção por *T. cruzi* (SILBERSTEIN et al., 2021). Em concordância, células de adenocarcinoma de colón humano (Caco-2) são resistentes à infecção por *T. cruzi* (ARIAS-DEL-ANGEL; MANNING-CELA; SANTILLÁN, 2020). Em contrapartida, além da maior taxa de invasão observamos na MDA-MB-231 um maior número de parasitas em 300 células (Figura 1B).

Em 1946, o casal russo de cientistas Grigorii Roskin e Nina Klyuyeva, descreveu o uso de uma preparação de *T. cruzi* que diminuiu o volume tumoral e, em alguns casos, mediou a remissão completa, tanto em modelos murinos quanto humanos (Kliueva e Roskin, 1963). Recentemente, vários estudos confirmaram os efeitos antitumorais da infecção induzida por *T. cruzi*. Oliveira et al. (2001) demonstraram que ratos infectados com *T. cruzi* resistem a carcinomas induzidos quimicamente (Oliveira et al., 2001). Já Kallinikova et al. mostraram que *T. cruzi* possui tropismo por células tumorais, o que pode explicar o fato de a MDA-MB-231 ter um maior número de células infectadas (Kallinikova et al., 2001).

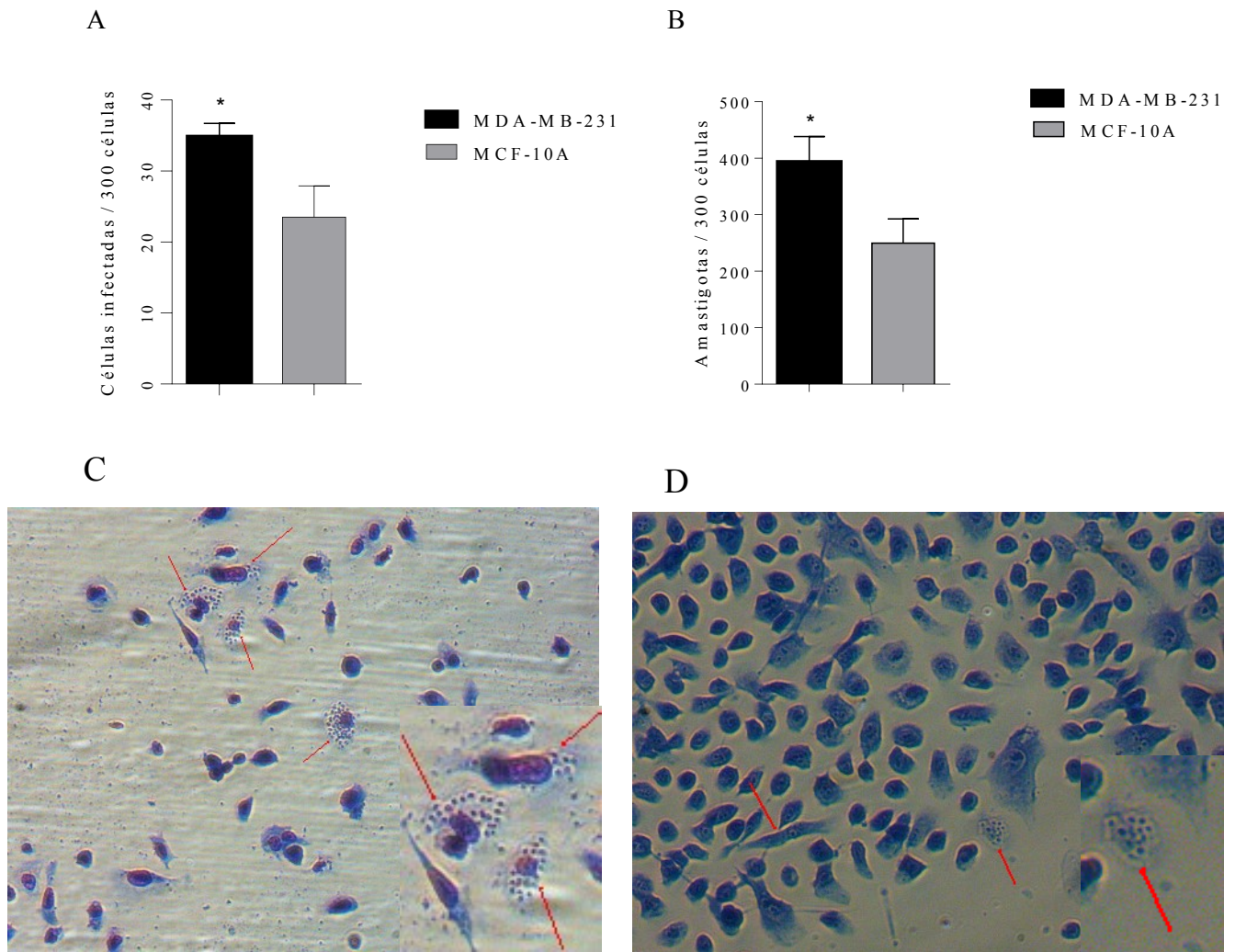


Figura 1. *T. cruzi* invade mais MDA-MB-231 do que MCF-10A. As linhagens celulares MCF-10A e MDA-MB-231 foram plaqueadas em concentração de 1×10^5 células/poço para o ensaio de invasão. As células foram incubadas *overnight* e desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (parasita:célula). Após duas horas de infecção foram fixadas com solução *Bouin* e coradas com *Giemsa*. **A** Quantidade de células infectadas em 300 células totais. **B** Quantidade de TCTY em 300 células totais. **Imagem representativa de MDA-MB-231 (C) e MCF-10A (D) infectadas por *T. cruzi*.** Coloração com *Giemsa*. Imagens obtidas com o microscópio invertido Nikon Ti-S com aumento de 20x. Em ambas as imagens são indicadas, pelas setas vermelhas, células infectadas. A diferença estatística foi calculada utilizando o teste T e valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

4.2 Linhagem MCF-10A apresenta maior taxa de replicação

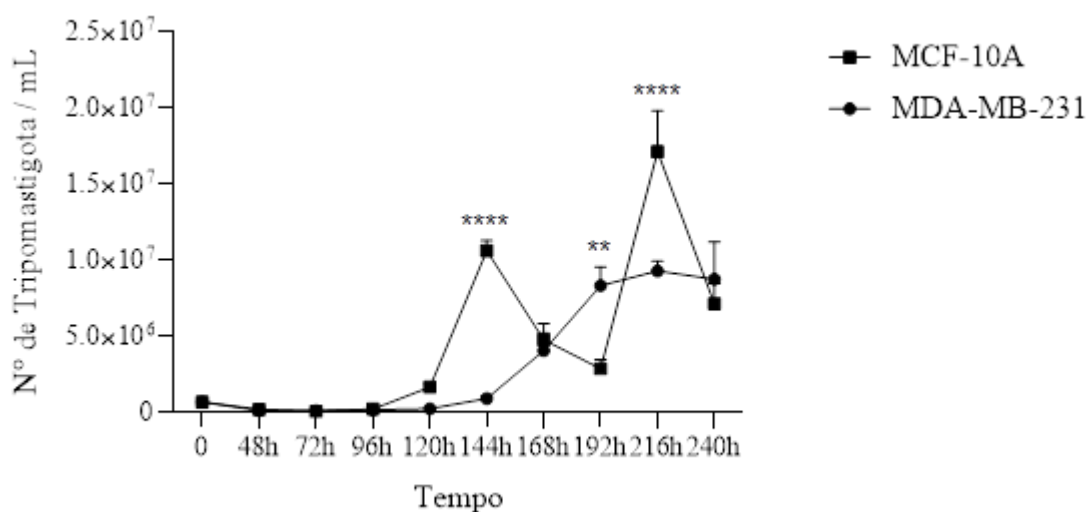
Como observamos que MDA-MB-231 e MCF-10A podem ser infectadas por *T. cruzi*, decidimos comparar a taxa de replicação do parasita contando o número de tripomastigotas liberados no sobrenadante. Para tanto cultivamos MDA-MB-231 e MCF-10A (7×10^4 /poço) *overnight*. No dia seguinte lavamos os poços e infectamos com a cepa

Y do *T. cruzi* (10 parasitos por célula). Após 2 horas de invasão, os poços foram lavados e o meio completo substituído. Após 2 dias de infecção, contamos diariamente até o 10º dia o número de tripomastigotas livres no sobrenadante. A quantificação revelou uma liberação muito maior de formas tripomastigotas por MCF-10A do que por MDA-MB-231 (Figura 3).

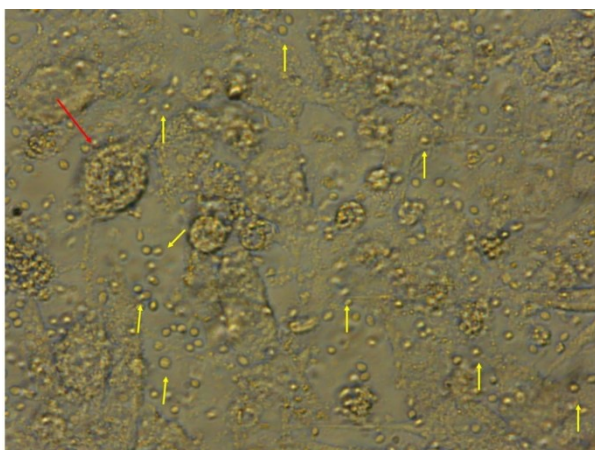
No sexto dia (tempo de 144 horas), um maior número de tripomastigotas foi contado nos sobrenadantes da MCF-10A, no entanto, no sétimo dia e no oitavo dia (tempo de 168 e 192 horas) houve uma queda. Em contrapartida nos mesmo dias houve um aumento na liberação de formas tripomastigotas na MDA-MB-231. Contudo, no nono dia (tempo de 216 horas) a MCF-10A apresentou mais parasitas liberados em comparação a MDA-MB-231 e no décimo dia teve uma queda novamente (tempo de 240 horas).

Na corrente sanguínea de mamíferos, tripomastigotas metacíclicos invadem células de vários tecidos e se transformam em amastigotas. Formas amastigotas se proliferam no citoplasma da célula para formar um pseudocisto (DVORAK, 1976; ANDREWS, 1993). Em alta densidade, amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos que são liberados após a lise celular para a corrente sanguínea podendo invadir outras células ou serem ingeridos novamente pelo inseto vetor, fechando assim o ciclo (DE SOUZA, 2000; MORTARA et al., 2008; RASSI; RASSI Jr., 2008; HERNÁNDEZ-OSORIO et al., 2010). É notório a importância da forma amastigota para o processo de infecção visto que funciona como uma forma intermediária para a tripomastigota. Corroborando nossos dados Tyler e Engman (2001) observaram que à medida que o número de formas tripomastigotas cai, as formas amastigotas se acumulam (KM; DM, 2001b). Logo podemos inferir que há a formação demasiada de ninhos de amastigotas durante a queda do número de formas tripomastigotas livres no sobrenadante das células MCF-10A.

A



B



C

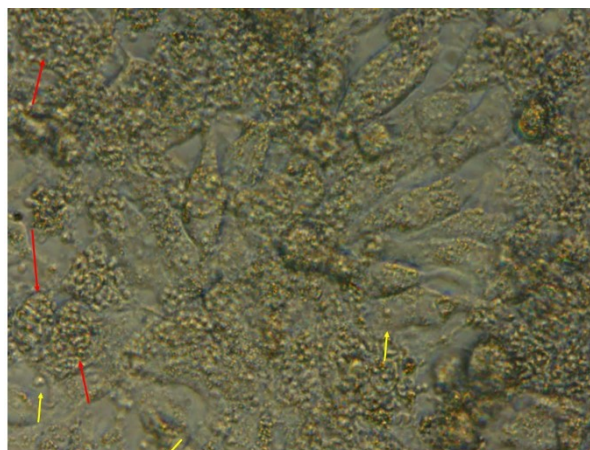


Figura 3. Linhagem MCF-10A apresenta maior liberação de formas tripomastigotas no sobrenadante. As linhagens celulares MCF-10A e MDA-MB-231 foram plaqueadas em concentração de 7×10^4 células/poço. As células foram incubadas *overnight* e desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (parasita:célula). O número de tripomastigotas viáveis liberados nos sobrenadantes foi avaliado por 9 dias, em câmara de Neubauer, todo dia após o segundo dia de infecção. **Imagens representativas do ensaio na MDA-MB-231 (B) e MCF-10A (C).** Imagens obtidas do último dia com o microscópio invertido Nikon Ti-S com aumento de 40x. Em ambas as imagens os ninhos de amastigotas são indicados pelas setas vermelhas e as formas amastigotas livres no sobrenadante são indicadas pelas setas amarelas.

Nossos resultados mostraram que a MCF-10A, uma linhagem celular epitelial não transformada de mama humana, é suscetível à infecção por *T. cruzi*, sendo capaz de fornecer um ambiente propício para a replicação e diferenciação do parasita e a liberação de formas infectantes viáveis. E a MDA-MB-231 pareceu ser mais suscetível ainda, uma

vez que as células não apresentaram a queda no número de parasitas no sobrenadante, não formando, conseqüentemente, ninhos de amastigotas. Acreditamos que as células tumorais sofrem lise celular prematuramente, uma vez que observamos poucos ninhos e muitas formas amastigotas no sobrenadante (Figura 3B). Alguns trabalhos apontam a existência de um subciclo alternativo, no qual as formas amastigotas provenientes da lise precoce de células infectadas, chamadas amastigotas extracelulares são capazes de infectar outras células (DE CARVALHO; DE SOUZA, 1986; HUDSON; SNARY; MORGAN, 1984; BEHBEHANI, 1973; ALVES; MORTARA, 2009).

No ensaio de multiplicação não houve diferença estatística entre as duas células (Figura 4), assim como no ensaio de replicação no tempo de 72 horas (Figura 3).

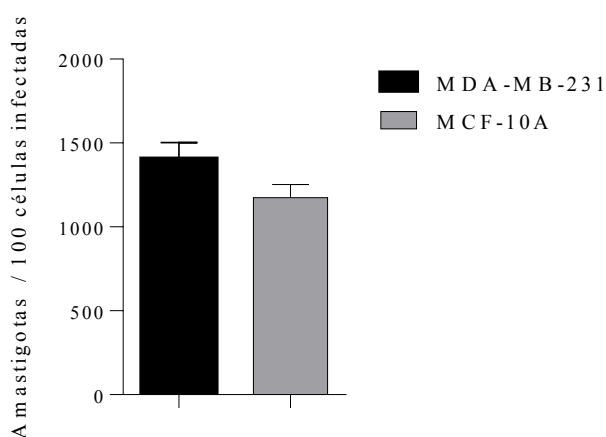


Figura 4. Ensaio de Multiplicação de parasitas. As linhas celulares MCF-10A e MDA-MB-231 foram plaqueadas em concentração de 1×10^5 células/poço. As células foram incubadas *overnight* e desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (parasita:célula). Após 72 horas de infecção foram fixadas com solução *Bouin* e coradas com *Giemsa*. A diferença estatística foi calculada utilizando o teste T e valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

4.3 *T. cruzi* está diretamente envolvido no processo migração celular

A partir da observação da suscetibilidade de ambas as células à infecção por *T. cruzi* decidimos analisar essa variante na migração celular. Para tanto, foi analisada a migração celular vertical com o uso de *transwell*. Com a análise estatística observamos uma redução significativa na migração celular no grupo infectado em ambas as linhagens

celulares, mas principalmente na MDA-MB-231 (Figura 5A e 5B). As Figuras 5C e 5D são a representação qualitativa desse resultado.

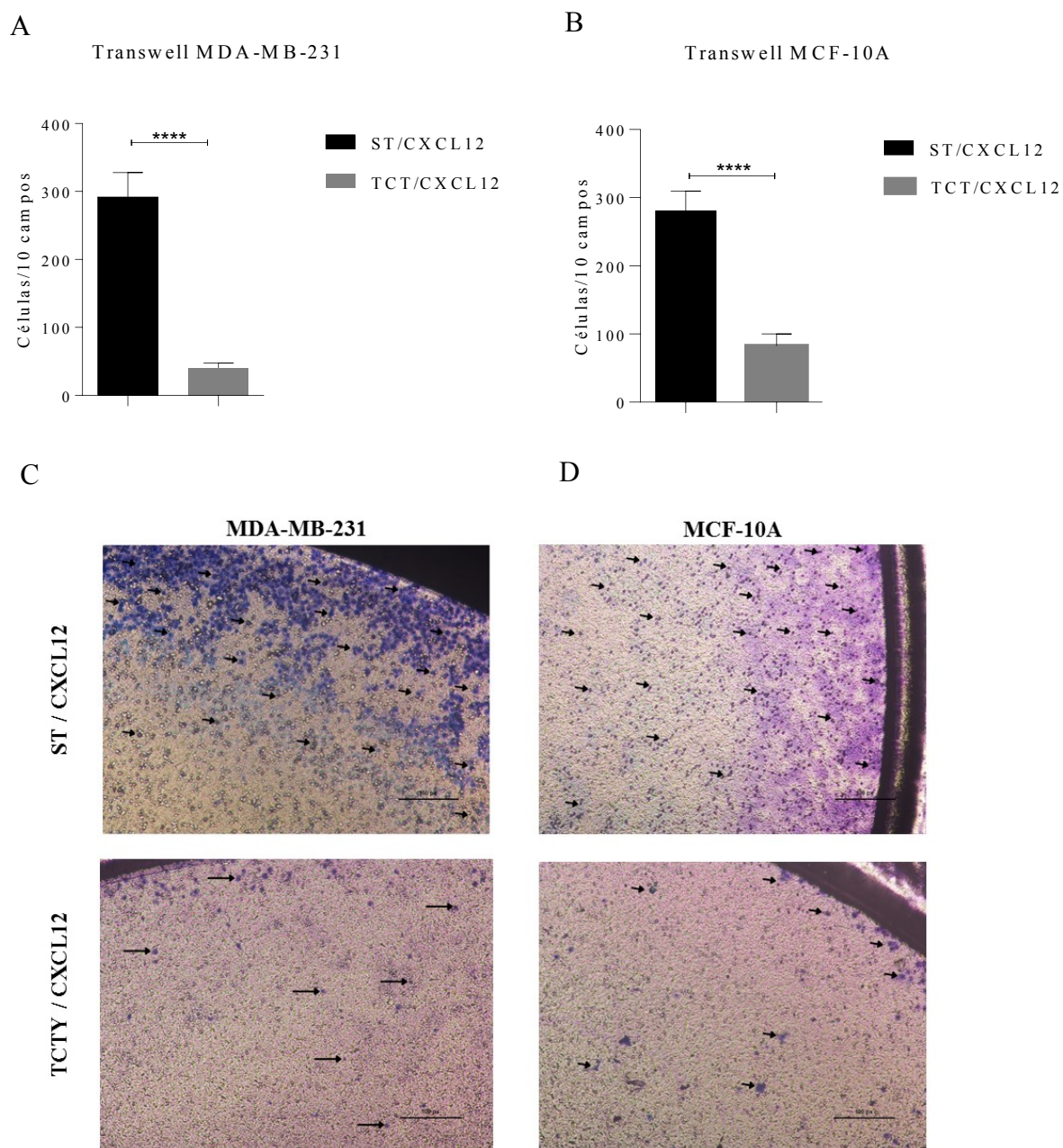


Figura 5. *T. cruzi* está diretamente envolvido no processo migração celular. Ensaio de Migração Vertical da MDA-MB-231. B (A) e da MCF-10A. As células (1x10⁵/ml) foram incubadas com e sem TCTY (ST). A câmara superior continha células no meio de cultura e a câmara inferior continha 20 ng/ml CXCL12 (quimioatraente). Células foram infectadas 1h antes com *T. cruzi* (10:1) e em seguida adicionadas na câmara superior e a capacidade migratória dessas células através de uma membrana de polycarbonato presente em um sistema *transwell* foi avaliada após 6 h a 37°C em 5% CO₂. As imagens foram usadas para contar o número de células usando o *software ImageJ*. **Imagens representativas do Ensaio de Migração Vertical da MDA-MB-231 (C) e da MCF-**

10A (D). As imagens foram adquiridas usando um microscópio Leica DM 500 com aumento de 10x. As setas pretas indicam as células que migraram.

É descrito na literatura que a maioria das mortes causadas por câncer de mama não se deve ao sítio primário do tumor, mas sim à formação de metástases em outros órgãos do corpo (WEIGELT et al., 2005). Lesões metastáticas são formadas a partir de células cancerosas que migram de tumores primários avançados (SCHARDT et al., 2005). A influência do microambiente na invasão e migração das células cancerosas é autônoma da célula e dependente do contexto do tecido (SPILL et al., 2016).

No contexto de migração celular a angiogênese possui um papel primordial. A angiogênese é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (CARMELIET, 2003). No entanto, o crescimento exacerbado ou remodelamento anormal dos vasos pode provocar câncer, distúrbios inflamatórios, hipertensão pulmonar e doenças oftalmológicas (CARMELIET, 2003; FOLKMAN, 2007; CARMELIET e JAIN, 2011). Teixeira (2017) demonstrou que a rP21 inibe a angiogênese in vitro e in vivo. Logo, nossos dados sugerem que o próprio parasita, assim como sua P21 recombinante (BORGES et al., 2020), reduz significativamente a migração celular, prejudicando a metástase e criando um ambiente desfavorável para o tumor.

A Calreticulina do *T. cruzi* (TcCalr) é proteína funcional e estruturalmente homóloga ao CALR humano (HuCALR) (RAMOS et al., 1991; FERREIRA et al., 2004). TcCalr apresenta propriedade antiangiogênicas in vitro, in vivo, ex vivo e em ovo (LOPEZ et al., 2010; MOLINA et al., 2005; TOLEDO et al., 2010), com maior atividade, quando comparado com seu homólogo humano. A inoculação peritumoral de rTcCalr, seja em modelos de adenocarcinoma mamário ou melanoma, diminui a nível proliferativo de células tumorais in vitro e o volume tumoral in vivo (ABELLO-CACERES et al., 2016; RAMIREZ-TOLOZA et al., 2014). Os efeitos antitumorais in vivo da proteína recombinante são praticamente idênticos aos obtidos com a infecção do parasita e, em ambos os casos, esse efeito é revertido com anticorpos anti-rTcCalr (ABELLO-CACERES et al., 2016). Ademais, a ligação do TcCalr aos receptores Scavenger diminui o processo neoangiogênico (SOSONIUK-ROCHE et al., 2020).

4.4 *T. cruzi* interage com o receptor CXCR4

Com a finalidade de demonstrar a interação do parasita com o receptor CXCR4 durante o processo de invasão celular MCF-10A e MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/poço). Em seguida, as células foram desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (10 parasitas por célula) durante duas horas. Depois as células foram lavadas com PBS e fixadas em diferentes momentos (3, 6, 9 e 12 horas pós-infecção). Observamos uma concentração de CXCR4 entorno do parasita em ambas as linhagens celulares, evidenciando a interação *T. cruzi*/CXCR4 (Figura 6 e 7). Na MDA-MB-231 houve maior concentração da marcação do receptor nos tempos de 3, 9 e 12 horas. Já na MCF-10A a marcação foi mais evidente em todos os tempos, quando comparada com a linhagem celular tumoral.

O CXCR4 é superexpresso em mais de 23 tipos de cânceres humanos, incluindo o câncer de mama, e contribui para o crescimento do tumor, angiogênese, metástase e resistência terapêutica (Balkwill, 2004b; Darash-Yahana et al., 2004; Furusato, Mohamed, Uhlen e Rhim, 2010; Muller et al., 2001; Vandercappellen, Van Damme, & Struyf, 2008; Zlotnik, 2008). Acredita-se que as células cancerosas sequestram o eixo CXCR4 / CXCL12 para estabelecer metástases em órgãos distantes, uma vez que os níveis de expressão de CXCL12 são mais elevados em locais comuns de metástases, como cérebro, medula óssea, pulmões e fígado (Ho, Shiwen, Abraham, Tsui, & Baker, 2012; Janowski, 2009; Muller et al., 2001; Yu et al., 2006). Corroborando esta hipótese, a inativação do eixo CXCR4 / CXCL12 resulta na redução da carga metastática em uma variedade de modelos de câncer em camundongos (CHATTERJEE; AZAD; NIMMAGADDA, 2014).

Há diversos trabalhos que demonstram a interação CXCR4/*T. cruzi*. Mendes et al. demonstraram que em seções congeladas de timo de camundongos infectados com *T. cruzi* houve um aumento na deposição de CXCL12 quando comparados com os grupos não infectados. E que, concomitantemente, os timócitos infectados apresentaram maior expressão de CXCR4, interferindo na migração celular durante (MENDES-DA-CRUZ et al., 2006). Já Talvani et al. avaliaram a expressão de CXCR4 em diferentes populações de leucócitos obtidas de pessoas infectadas ou não por *T. cruzi*, e demonstraram diferenças significativas na expressão de CXCR4 na superfície das células CD4⁺. A expressão foi maior em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica leve do que em indivíduos não infectados. No entanto, a expressão de CXCR4 foi menor na superfície de pacientes com células CD8⁺ e CD14⁺, com doença mais grave. O que pode ser

explicado por meio da correlação negativa entre a expressão de CXCR4 e o grau de disfunção cardíaca, devido a insuficiência cardíaca (TALVANI et al., 2004).

Logo, nossos dados sugerem que o *T. cruzi* interage com o CXCR4 nas células MCF-10A e MDA-MB-231 interferindo nos fenótipos de migração e invasão dessas células.

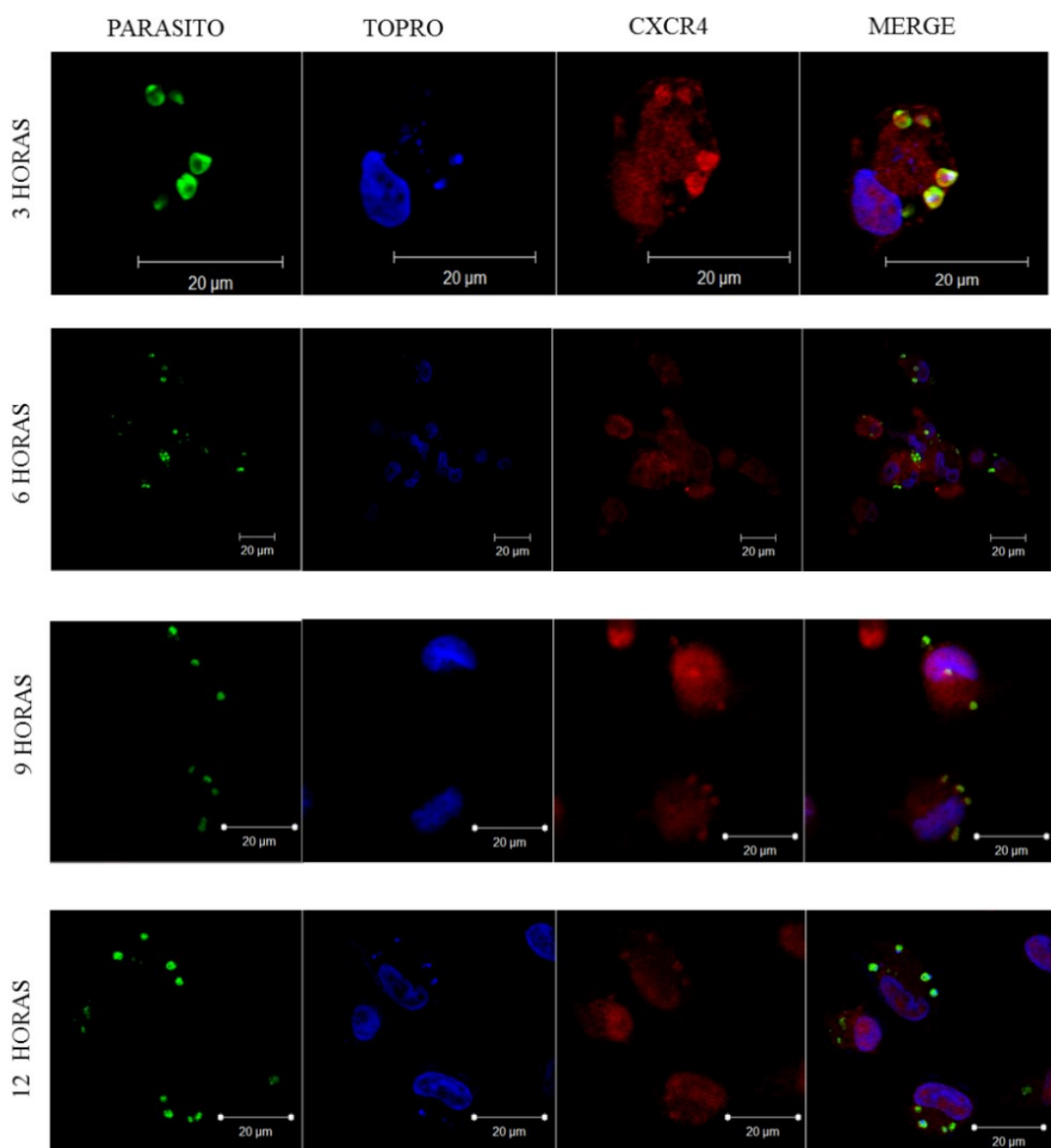


Figura 6. Avaliação dos níveis de CXCR4 na MDA-MB-231 infectada com TCTY por microscopia confocal. As células foram marcadas com anticorpos primários anti-CXCR4 (diluído 1:100) e soro chagásico humano (diluído 1:500) durante a noite a 4 ° C. No dia seguinte foram incubadas com anticorpos secundários AF 568 (diluído 1:200), AF 488 (diluído 1:200) e TOPRO (coloração nuclear, diluído 1:200). As lâminas foram analisadas por microscopia confocal. As imagens foram obtidas em um microscópio Zeiss LSM 510 META com aumento de 63 ×.

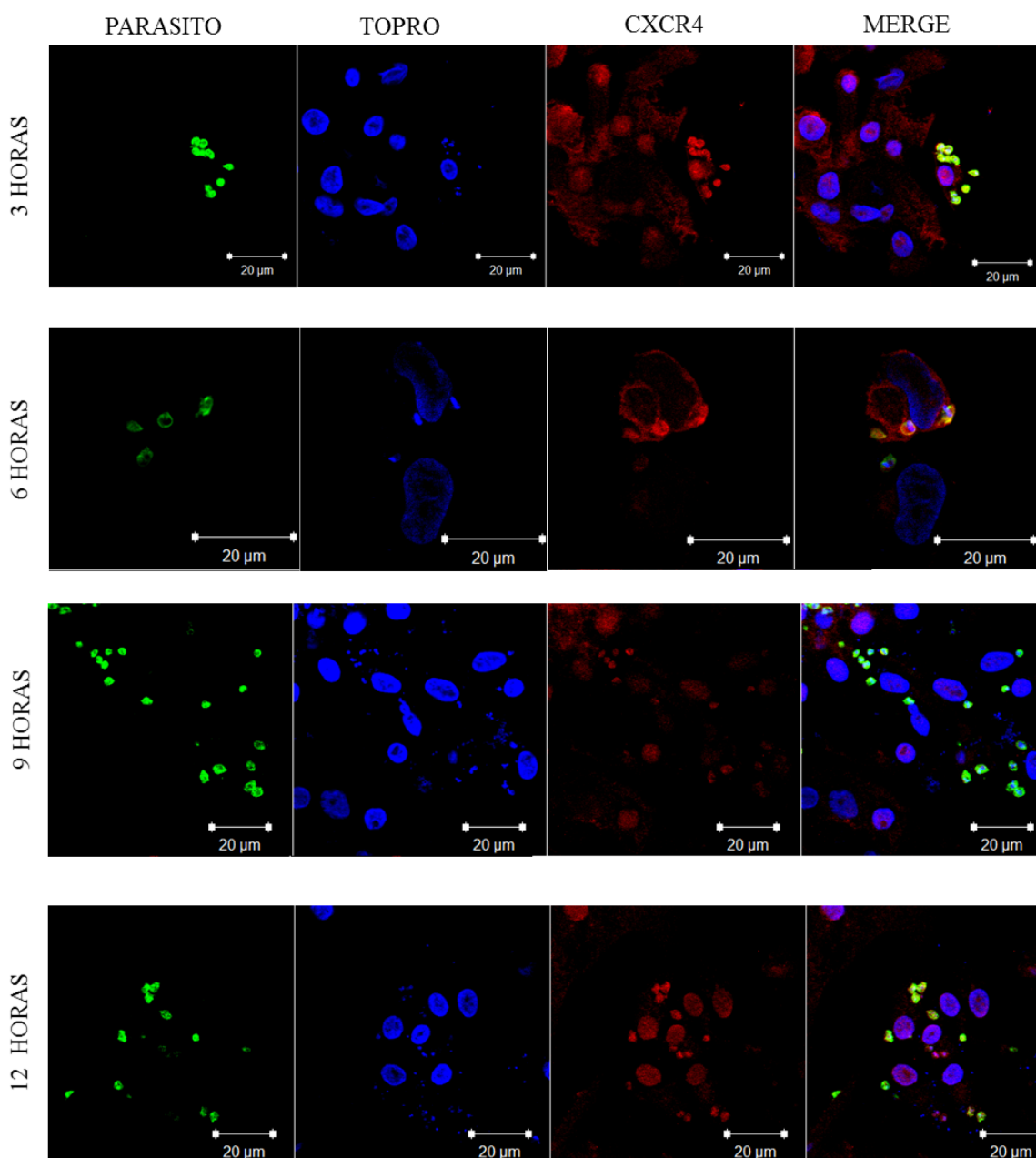


Figura 7. Avaliação dos níveis de CXCR4 na MCF-10A infectada com TCTY por microscopia confocal. As células foram marcadas com anticorpos primários anti-CXCR4 (diluído 1:100) e soro chagásico humano (diluído 1:500) durante a noite a 4 ° C. No dia seguinte foram incubadas com anticorpos secundários AF 568 (diluído 1:200), AF 488 (diluído 1:200) e TOPRO (coloração nuclear, diluído 1:200). Após as lavagens, as lâminas foram montadas em PPD e analisadas por microscopia confocal. As imagens foram obtidas em um microscópio Zeiss LSM 510 META com aumento de 63 ×.

5. CONCLUSÃO

Demonstramos que tanto a linhagem tumoral metastática triplo negativa de mama humana (MDA-MB-231) quanto a linhagem epitelial não transformada de mama humana (MCF-10A) são suscetíveis à infecção por *T. cruzi*. Mas a MDA-MB-231 apresentou ser mais suscetível, uma vez que apresentou maior taxa de invasão, menor formação de ninhos de amastigotas e, conseqüentemente, maior liberação de formas amastigotas e menor de formas tripomastigotas no sobrenadante. Ademais, *T. cruzi* é capaz de se ligar ao receptor CXCR4 e reduzir significativamente a migração celular em ambas as linhagens celulares, interferindo na formação de metástase. Logo, assim como a rP21, *T. cruzi* apresenta características antitumorais atuando como uma molécula antagonista ao principal ligante do receptor CXCR4, a quimiocina CXCL12.

6. REFERÊNCIAS

- ABELLO-CACERES, P., PIZARRO-BAUERLE, J., ROSAS, C., MALDONADO, I., AGUILAR-GUZMAN, L., GONZALEZ, C., RAMIREZ, G., FERREIRA, J., FERREIRA, A., 2016. Does native *Trypanosoma cruzi* calreticulin mediate growth inhibition of a mammary tumor during infection? **BMC Cancer** 16, 731.
- ALVES, M.J.; MORTARA, R.A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104 (Supl. 1), p.76-88, 2009.
- ANDREWS, N.W., 1993. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biol. Res.** 26, 65–67.
- ARAÚJO, A.; JANSEN, A. M.; REINHARD, K.; FERREIRA, L. F. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 9 – 16, 2009. Fundação Oswaldo Cruz.
- ARIAS-DEL-ANGEL, J. A.; MANNING-CELA, R. G.; SANTILLÁN, M. Dynamics of Mammalian Cell Infection by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 559660, 2 out. 2020.
- ATAYDE, VD, JASIULIONIS, MG, CORTEZ, M. E YOSHIDA, N. (2008). Uma proteína recombinante baseada na molécula de superfície gp82 do *Trypanosoma cruzi* induz a morte celular por apoptose em células de melanoma. **Melan. Res.** 18, 172-183. doi: 10.1097 / CMR.0b013e3282fecaab.
- 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
- BARRETO, M. P. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. (Brener, Z., Andrade, Z. A. Eds.) Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 89 – 151, 1979.
- BEHBEHANI, K. Developmental cycles of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909) in mouse peritoneal macrophages in vitro. **Parasitology**, v. 66, p. 343-353, 1973.
- BESTETTI, R. B.; MUCCILLO, G. Clinical course of chagas' heart disease: A comparison with dilated cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, v. 60, n. 2, p. 187–193, 25 jun. 1997.
- BOLLINGER S. Desafios biopsicossociais e necessidades de mulheres afro-americanas com câncer de mama triplo-negativo. **Saúde e Serviço Social** . 2018; 43 (2): 84–92. doi: 10.1093 / hsw / hly006.
- BORGES, B. C. et al. The Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Interacts With CXCR4 Receptor and Abrogates the Invasive Phenotype of Human Breast Cancer Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 0, p. 1111, 19 out. 2020.

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.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, v. 27, p. 347 - 382, October 1973.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, v. 9, n. 6, p. 653-60, Jun 2003.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, v. 473, n. 7347, p. 298-307, May 19 2011.

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.

CHEN, L., HE, Z., QIN, L., LI, Q., SHI, X., ZHAO, S., et al. (2011). Efeito antitumoral da infecção do parasita da malária em um modelo de câncer de pulmão de lewis murino por meio da indução da imunidade inata e adaptativa. *PLoS One* 6. doi: 10.1371 / journal.pone.0024407.

CHENG Y, MA XL, WEI YQ, et al. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019 Apr;1871(2):289-312.

CHATTERJEE, S.; AZAD, B. B.; NIMMAGADDA, S. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. *Advances in cancer research*, v. 124, p. 31, 2014

COJOC, M., PEITZSCH, C., TRAUTMANN, F., POLISHCHUK, L., TELEGEEV, GD E DUBROVSKA, A. (2013). Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis . *Oncol. Alvo. Ther.* 30, 1347–1361. doi: 10.2147 / OTT.S36109.

DARANI, HY E YOUSEFI, M. (2012). Parasitas e cânceres: antígenos de parasitas como possíveis alvos da imunoterapia contra o câncer. *Fut. Oncol.* 8, 1529–1535. doi: 10.2217 / fon.12.155.

DARASH-YAHANA M, PIKARSKY E, ABRAMOVITCH R, ZEIRA E, PAL B, KARPLUS R, et al. Papel dos altos níveis de expressão de CXCR4 no crescimento tumoral, vascularização e metástase. *FASEB Journal*. 2004; 18 (11): 1240–1242.

D'AVILA, H.; TOLEDO, D. A. M.; MELO, R. C. N. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. *Mediators of Inflammation*, v. 2012, p. 1-11, April 2012.

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

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

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

DIETZE EC., SISTRUNK C., MIRANDA-CARBONI G., O'REGAN R., SEEWALDT VL. (2015). Câncer de mama triplo-negativo em mulheres afro-americanas: disparidades versus biologia. **Nature Reviews Cancer** . 15 (4): 248–254. doi: 10.1038 / nrc3896.

DONG, C. et al. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. **Cancer Cell** 23, 316–331 (2013).

DVORAK, J.A., 1976. New in vitro approach to quantification of *Trypanosoma cruzi* vertebrate interactions. In: American Trypanosomiasis Research. PAHO Scientific Publication No. 318 Session II. A. The Parasite and the Host's Response. PAHO, Washington, DC, 109–120.

F, B. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. **Seminars in cancer biology**, v. 14, n. 3, p. 171–179, 2004.

FERREIRA, V., VALCK, C., SANCHEZ, G., GINGRAS, A., TZIMA, S., MOLINA, M.C., SIM, R., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A., 2004. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol** 172, 3042–3050.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, v. 6, n. 4, p. 273-86, Apr 2007. ISSN 1474-1776 (Print) 1474-1776.

FURUSATO B, MOHAMED A, UHLEN M, RHIM JS. CXCR4 e câncer. **Pathology International**. 2010; 60 (7): 497–505.

GELMON, K. et al. Targeting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes. **Ann. Oncol.** 23, 2223–2234 (2012).

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

HO TK, SHIWEN X, ABRAHAM D, TSUI J, BAKER D. Stromal-cell-derivado factor-1 (SDF-1) / CXCL12 como alvo potencial da angiogênese terapêutica na isquemia crítica da perna. *Cardiology Research and Practice*, 2012. 2012 : 143209.

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

HUGHES CE, NIBBS RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 2018 Aug;285(16):2944-2971.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Atlas da mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Base de dados.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020**: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019a.

JANOWSKI M. Diversidade funcional de variantes de splicing SDF-1. *Adesão e migração celular*. 2009; 3 (3): 243–249.

JC, D. et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49Suppl 1, n. Suppl 1, p. 3–60, 1 dez. 2016.

JULIUS Wagner-Jauregg. In: The Nobel Prize-Winners and the Nobel Foundation, 1901-1937. Zurich: **The Central European Times Publishing**. p.213-214. 1938.

Kallinikova, V.D., Matekin, P.V., Ogloblina, T.A., Leikina, M.I., Kononenko, A.F., Sokolova, N.M., Pogodina, L.S., 2001. [Anticancer properties of flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909]. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 299–311.

KIM, JO, JUNG, SS, KIM, SY, TAE, YK, SHIN, DW, LEE, JH, et al. (2007). Inibição do crescimento do carcinoma de pulmão de Lewis por *Toxoplasma gondii* através da indução de respostas imunes Th1 e inibição da angiogênese. *J. Korean Med. Sci.* 22, 38–46. doi: 10.3346 / jkms.2007.22.s.s38.

Kliueva, N.G., Roskin, G.I., 1963. [The antibiotic cruzin and its mechanism of action on cancer cells]. *Izvestiia Akademii nauk Kirgizskoi SSR. Serii biologicheskikh nauk* 3, 366–390

KREMENTSOV, N. (2009). *Trypanosoma cruzi*, câncer e a Guerra Fria. *Hist. Ciên. Saúde Mang.* 16, 75–94. doi: 10.1590 / s0104-59702009000500005.

LEE, A. & DJAMGOZ, M. B. A. Triple negative breast cancer: emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. **Cancer Treat. Rev.** 62, 110–122 (2018).

LEBERT JM, LESTER R, POWELL E, SEAL M, MCCARTHY J. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. **Curr Oncol.** (2018) 25:S142–50. doi: 10.3747/co.25.3954.

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.

LIU M., LIU Y., DENG L., et al. Perfis transcricionais de diferentes estados de células-tronco cancerígenas no câncer de mama triplo-negativo. **Molecular Cancer**. 2018; 17 (1): pág. 65. doi: 10.1186 / s12943-018-0809-x.

LIU, T., LI, X., YOU, S., BHUYAN, S. S., and DONG, L. (2016). Effectiveness of AMD3100 in treatment of leukemia and solid tumors: from original discovery to use in current clinical practice. *Exp. Hematol. Oncol.* 5:1. doi: 10.1186/s40164-016-005055

LOPEZ-COTARELO P, GOMEZ-MOREIRA C, CRIADO-GARCIA O., et al. Beyond Chemoattraction: Multifunctionality of Chemokine Receptors in Leukocytes. *Trends Immunol.* 2017 Dec;38(12):927-941.

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., 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. **PLoS neglected tropical diseases** 4, e730.

LOZANO, V. F. **Avaliação da atividade antiparasitária e efeito sinérgico de compostos cumarínicos comparados ao benzonidazol em duas cepas de *Trypanosoma cruzi*.** São Paulo. Dissertação. Universidade Bandeirantes de São Paulo. 2011.

LU, G., ZHOU, J., ZHAO, Y., LI, Q., GAO, Y., WANG, L., et al. (2019). Transcriptome Sequencing Investigated the Tumor-Related Factors Changes After *T. gondii* Infection. *Front. microbiol.* 10:181. doi: 10.3389/fmicb.2019.00181.

MANI, S. A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715 (2008).

MENDES-DA-CRUZ, D. A. et al. Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 6, p. 1486–1493, 1 jun. 2006.

MOHAMADI, F., SHAKIBAPOUR, M., and SHARAFI, S. M. (2019). Anti- *Toxoplasma gondii* antibodies attach to mouse cancer cell lines but not normal mouse lymphocytes. *Biomed. Rep.* 10, 183–188. doi: 10.3892/br.2019.1186.

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

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

MUCCI, J., RISSO, M. G., LEGUIZAMÓN, M. S., FRASCH, A. C. C., and CAMPETELLA, O. (2006). The trans sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. *Cell Microbiol.* 8, 1086–1095. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00689.x.

MÜLLER, A., HOMEY, B., SOTO, H., GE, N., CATRON, D., BUCHANAN, ME, et al. (2001). Envolvimento dos receptores de quimiocinas na metástase do câncer de mama. *Nature* 410, 50–56. doi: 10.1038 / 35065016.

Oliveira, E.C., Leite, M.S., Miranda, J.A., Andrade, A.L., Garcia, S.B., Luquetti, A.O., Moreira, H., 2001. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Carcinogenesis* 22, 737–740.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, n. 1, p. 34, 2013. CEVAP.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. **Chagas disease**The LancetLancet Publishing Group, , 6 jan. 2018.

PLUMELLE, Y., GONIN, C. E EDOUARD, A. (1997). Efeito da infecção por *Strongyloides stercoralis* e da eosinofilia na idade de início e no prognóstico da leucemia de células T do adulto. *Sou. J. Clin. Pathol.* 107, 81–87. doi: 10.1093 / ajcp / 107.1.81.

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.

RAKHA EA, EL-SAYED ME, GREEN AR, LEE AH, ROBERTSON JF, ELLIS IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2007 Jan 1;109(1):25-32. doi: 10.1002/cncr.22381. PMID: 17146782.

RAMÍREZ, G., VALCK, C., AGUILAR, L., KEMMERLING, U., LÓPEZ-MU, R., CABRERA, G., et al. (2012). Papéis da calreticulina do *Trypanosoma cruzi* nas interações parasita-hospedeiro e no crescimento tumoral. *Mol. Immunol.* 52, 133-140. doi: 10.1016 / j.molimm.2012.05.006.

RAMIREZ-TOLOZA, G., AGUILAR-GUZMAN, L., VALCK, C., ABELLO, P., FERREIRA, A., 2014. Is it all That Bad When Living with an Intracellular Protozoan? The Role of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin in Angiogenesis and Tumor Growth. *Frontiers in oncology* 4, 382.

RAMOS, R., JURI, M., RAMOS, A., HOECKER, G., LAVANDERO, S., PENA, P., MORELLO, A., REPETTO, Y., AGUILLON, J.C., FERREIRA, A., 1991. An immunogenetically defined and immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 44, 314–322.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

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

Riaz, A. (2019). Immunotherapeutic Potential of Plasmodium Against Cancer by Inducing Immunomodulation. *IJAR* 70, 8–18. doi: 10.7176/ALST.

RODRIGUES, A. A.; CLEMENTE, T. M.; SANTOS, M. A.; MACHADO, F. C.; GOMES, R. G. B.; MOREIRA, H. H. T.; CRUZ, M. C.; BRÍGIDO, P. C.; SANTOS, P. C. F.; MARTINS F. A.; BAHIA, D.; MARICATO, J. T.; JANINI, L. M. R.; REBOREDO, E. H.; MORTARA, R. A.; SILVA, C. V. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis. *Plos One*, v. 7, n. 12, p. 1-9, December 2012.

SALASSA, B. N.; ROMANO, P. S. Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence*, v. 10, n. 1, p. 460, 1 jan. 2019.

SARRIÓ, D. et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 68, 989–997 (2008).

SANTOS, E. F. et al. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 8, p. 1–16, 1 ago. 2020.

SCHARDT JA, MEYER M, HARTMANN CH, SCHUBERT F, SCHMIDT-KITTLER O, FUHRMANN C, POLZER B, PETRONIO M, EILS R, KLEIN CA. *Cancer Cell*. Setembro de 2005; 8 (3): 227-39.

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.

SILBERSTEIN, E. et al. Human Placental Trophoblasts Are Resistant to *Trypanosoma cruzi* Infection in a 3D-Culture Model of the Maternal-Fetal Interface. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 4 mar. 2021.

SMULSKI, C. R.; LONGHI, S. A.; AYUB, M. J.; EDREIRA, M. M.; SIMONETTI, L.; GÓMEZ, K. A.; BASILE, J. N.; CHALOIN, O.; HOEBEKE, J.; LEVIN, M. J. Interaction map of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein complex (stalk) and the elongation factor 2. *Molecular Recognition*, v. 24, n. 2, p. 359-370, March-April 2010.

SOSONIUK-ROCHE, E. et al. In vitro Treatment of a Murine Mammary Adenocarcinoma Cell Line with Recombinant *Trypanosoma cruzi* Calreticulin Promotes Immunogenicity and Phagocytosis. *Molecular Immunology*, v. 124, p. 51–60, 1 ago. 2020.

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.

Spill F, Reynolds DS, Kamm RD, Zaman MH *Curr Opin Biotechnol*. Agosto de 2016; 40 (): 41-48.

Stat Facts: Female Breast Cancer Subtypes. Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html>.

TALVANI, A. et al. Chemokine Receptor Expression on the Surface of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chagas Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 2, p. 214–220, 15 jan. 2004.

TANOWITZ, H. et al. Studies of in Vitro Infection by *Trypanosoma Cruzi*: I. Ultrastructural Studies on the Invasion of Macrophages and L-cells. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 1, p. 25–33, 1 jan. 1975.

TEICHER, B. A., and FRICKER, S. P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/ CXCR4 Pathway in Cancer. **Clin. Cancer Res.** 16, 2927–2932. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-092329.

TEIXEIRA, SC, LOPES, DS, NATALIE, S., GIMENES, C., TEIXEIRA, TL, SANTOS, M., et al. (2017). Insights mecanísticos sobre a atividade antiangiogênica da proteína 21 do *Trypanosoma cruzi* e seu potencial impacto no início da cardiomiopatia chagásica. **Sci. Rep.** 7: 44978. doi: 10.1038 / srep44978

TEIXEIRA, T. L. et al. Experimental evidences that P21 protein controls *Trypanosoma cruzi* replication and modulates the pathogenesis of infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, p. 103618, 1 out. 2019.

TEIXEIRA, TL, MACHADO, FC, ALVES, DA SILVA, A., TEIXEIRA, SC, BORGES, BC, et al. (2015). *Trypanosoma cruzi* P21: um novo alvo potencial para a terapia da cardiomiopatia chagásica. **Sci. Rep.** 5: 16877. doi: 10.1038 / srep16877.

THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890 (2009).

TODOROV, A. G.; EINICKER-LAMAS, M.; CASTRO, S. L.; OLIVEIRA, M. M.; GUILHERME, A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 41, p. 32182-32186, October 2000.

TOLEDO, V., RAMIREZ, G., VALCK, C., LOPEZ, N., RIBEIRO, C.H., MALDONADO, I., AGUILAR, L., LEMUS, D., FERREIRA, A., 2010. Comparative in vivo antiangiogenic effects of calreticulin from *Trypanosoma cruzi* and *Homo sapiens sapiens*. **Biological research** 43, 287–289

UBILLOS, L., FREIRE, T., BERRIEL, E., CHIRIBAO, M. L., CHIALE, C., FESTARI, M. F., et al. (2016). *Trypanosoma cruzi* extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers. **Int. J. Cancer** 138, 1719–1731. doi: 10.1002/ijc.29910

VAFZAIDEH, V. et al. **Editorial: Perspectives in Mammary Gland Development and Breast Cancer Research** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Frontiers Media S.A., , 25 ago. 2020.

VALCK, C., RAMI, G., RODRÍ, M., RIBEIRO, C., LO, NC, MALDONADO, I., et al. (2010). Efeitos Antiangiogênicos e Antitumorais da Calreticulina do *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 4, 1-9. doi: 10.1371 / journal.pntd.0000730.

VANDERCAPPELLEN J, VAN DAMME J, STRUYF S. O papel das quimiocinas CXC e seus receptores no câncer. *Cartas de câncer*. 2008; 267 (2): 226–244.

VENKITARAMAN, R. (2010). Triple-negative/basal-like breast cancer: Clinical, pathologic and molecular features. *Exp. Rev. Anti. Ther.* 10, 199–207. doi: 10.1586/ERA.09.189.

WEIGELT, B., PETERSE, JL E VAN'T VEER, LJ (2005). Metástase de câncer de mama: marcadores e modelos. *Nat. Rev. Cancer* 5, 591–602. doi: 10.1038 / nrc1670.

WHISNER, CM E AKTIPIS, CA (2019). O papel do microbioma na iniciação e progressão do câncer: como os micróbios e as células cancerosas utilizam o excesso de energia e promovem o crescimento uns dos outros. *Curr. Nutr. Rep.* 8, 42–51. doi: 10.1007 / s13668-019-0257252.

YU L, CECIL J, PENG SB, SCHREMENTI J, KOVACEVIC S, PAUL D, et al. Identificação e expressão de novas isoformas do fator 1 derivado de células estromais humanas . *Gene*. 2006; 374 : 174–179.

ZHIGUNOVA, AV, KRAVTSOV, EG, YASHINA, NV, DALIN, MV E KARPENKO, LP (2013). Efeitos de anticorpos específicos e células imunocompetentes no crescimento do tumor na experiência de transferência passiva. *Touro. Exp. Biol. Med.* 154, 762-764. doi: 10.1007 / s10517-013-2050-3.

ZHOU, KX, XIE, LH, PENG, X., GUO, QM, WU, QY, WANG, WH, et al. (2018). O antagonista de CXCR4 AMD3100 aumenta a resposta das células de câncer de mama triplo-negativas MDA-MB-231 à radiação ionizante. *Cancer Lett.* 418, 196–203. doi: 10.1016 / j.canlet.2018.01.009.

ZLOTNIK A. Novos insights sobre o papel do CXCR4 na metástase do câncer. *Journal of Pathology*. 2008; 215 (3): 211–213.