

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

**A infecção por *Trypanosoma cruzi* e a forma recombinante da sua proteína P21 altera a migração de células de câncer de mama triplo-negativo e de células não tumorais**

Anna Clara Azevedo Silveira

Uberlândia – MG

Novembro/2021

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

**A infecção por *Trypanosoma cruzi* e a forma recombinante da sua proteína P21 altera a migração de células de câncer de mama triplo-negativo e de células não tumorais**

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

Anna Clara Azevedo Silveira  
Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva  
Coorientadora: Dra. Bruna Cristina Borges

Uberlândia – MG  
Novembro/2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S587  
2021

Silveira, Anna Clara Azevedo, 1995-  
A infecção por Trypanosoma cruzi e a forma  
recombinante da sua proteína P21 altera a migração de  
células de câncer de mama triplo-negativo e de células  
não tumorais [recurso eletrônico] / Anna Clara Azevedo  
Silveira. - 2021.

Orientadora: Claudio Vieira da Silva.  
Coorientadora: Bruna Cristina Borges.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de  
Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.611>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Silva, Claudio Vieira da, 1972-,  
(Orient.). II. Borges, Bruna Cristina, 1990-,  
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
IV. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

|                                    |  |                 |       |                       |       |
|------------------------------------|--|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em:      | Imunologia e Parasitologia Aplicadas   |                 |       |                       |       |
| Defesa de:                         | Mestrado nº 273  |                 |       |                       |       |
| Data:                              | um de novembro de dois mil e vinte um  | Hora de início: | 14:00 | Hora de encerramento: | 16h26 |
| Matrícula do Discente:             | 11922IPA002  |                 |       |                       |       |
| Nome do Discente:                  | Anna Clara Azevedo Silveira  |                 |       |                       |       |
| Título do Trabalho:                | A infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> e a forma recombinante da sua proteína P21 altera a migração de células de câncer de mama triplo-negativo e de células não tumorais                  |                 |       |                       |       |
| Área de concentração:              | Imunologia e Parasitologia Aplicadas   |                 |       |                       |       |
| Linha de pesquisa:                 | Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros   |                 |       |                       |       |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Avaliação do impacto da proteína recombinante 21 de <i>Trypanosoma cruzi</i> na indução de dormência do protozoário após tratamento com benzonidazol em mioblastos murinos e modelos in vivo |                 |       |                       |       |

Reuniu-se, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Profa. Dra. Diana Bahia - UFMG / ICB; Prof. Dr. Tiago W.P. Mineo - UFU/ ICBIM/PPIPA; Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva - UFU/ ICBIM/PPIPA- (Presidente) orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

**Aprovada.**

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Vieira da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/11/2021, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Wilson Patriarca Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/11/2021, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **DIANA BAHIA, Usuário Externo**, em 04/11/2021, às 12:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3140385** e o código CRC **E33E7907**.

---

## **Agradecimentos**

“No fim tudo dá certo, e se não deu certo é porque não chegou ao fim” (Fernando Sabino).

Ao longo da minha graduação não imaginei estar onde cheguei e superar o que já superei, mas essa frase sempre foi um alicerce para continuar a seguindo e superando tudo. Estes dois anos foi anos atípicos, difíceis e de muitas inseguranças, mas tive o apoio de pessoas incríveis que contribuiu para a finalização do meu Mestrado. Dentre essas pessoas meu Orientador Claudio Vieira da Silva, minha Coorientadora Bruna Cristina Borges e o Cassiano Costa Rodrigues, agradeço pela orientação, paciência, ensinamentos e suporte nestes dois anos. Sou grata ao Professor Claudio por ter me acolhido em seu laboratório, uma aluna de outra cidade sem muita experiência, mas que juntos conseguimos realizar vários feitos. Bruna, obrigada por socorrer nos momentos de aperto, das conversas e ensinamentos. Cassiano, obrigada por tudo, você era quem estava no laboratório orientando os experimentos, vendo e consertando meus erros, nos momentos de desesperos e felicidades. Conviver com vocês ajudou no meu amadurecimento, sou muito grata a todos.

Agradeço aos membros do Laboratório de Tripanosomatídeos-LATRI (Cassiano, Bruna, Geovanna, Rayana, Samuel) por toda ajuda.

Agradeço aos meus pais por sempre apoiar minhas escolhas, Edênia Azevedo de Freitas Silveira e Nailton Celestino Silveira; aos meus familiares que mesmo a distância incentiva e apoia minhas escolhas. Aos meus amigos em especial agradeço a minha amiga/irmã Vitelhe Ferreira de Almeida pelo apoio, por sempre ouvir meus desabafos, por sempre estar presente ajudando quando necessário, pelas conversas e os anos de convivência e amizade. Obrigada Ingrid, Maria Cecilia, Afonso, Guilherme por ouvir, apoiar mesmo eu longe e as vezes ausente por causa da correria dos experimentos.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, e ao programa de Imunologia e Parasitologia Aplicada por todo o conhecimento e experiência que aqui adquiri. Aos órgãos FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro dado durante a minha pós-graduação.

Agradeço ao universo por proporcionar toda essa incrível experiência, crescimento, e momentos difíceis que moldou quem eu sou hoje.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem

Akt - Proteína Kinase B

ATCC - American Type Culture Collection

BESM - célula do musculo esquelético do embrião bovino

CD - Cluster of differentiation

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

CXCL12 - C-X-C motivo ligante 12

CXCR4 - C-X-C receptor de quimiocina tipo 4

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

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EGF - Fator de Crescimento Epidermal

GP82 – Glicoproteína de superfície de 82 kDa

GRK - Receptor de quinase acoplado a proteína G

HER-2 – Receptor de crescimento epidérmico humano 2

HIF-1 $\alpha$  - Fator induzível por hipóxia - 1 $\alpha$

IPTG - Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

kDa - Quilo Dalton

L - Litros

LB - Meio Luria-Bertani

M - Molar

MAPKs - Proteínas quinases ativadas por mitógenos

mL - Mililitros

mM - Milimolar

mm<sup>2</sup> - Milímetros quadrados

MPO - Mieloperoxidase

NF- $\kappa$ B - Fator nuclear kappa B

ng - Nanogramas

nm - Nanômetro

°C - Graus Celsius

OD - Densidade Óptica (absorbância)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

PBS - Solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2

pH - Potencial hidrogênico

PI3K/AKT - Fosfatidilinositol-3-quinase/ Proteína quinase B

PLC - Fosfolipase C6

RE -Receptor de estrogênio

RP – Receptor progesterona

rpm - Rotações por minuto

RPMI - Meio Roswell Park Memorial Institute

rTcCRT -Proteína recombinante calreticulina

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

SDS – Dimetilsulfóxido

SDF-1 – Fator 1 derivado de célula do estroma

SFB - Soro fetal bovino

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

shRNA - short harpain RNA

TcCRT – Proteína calreticulina

U - Unidades

VEFGA – Fator de crescimento endotelial vascular A

$\mu$ g - Microgramas

$\mu$ L - Microlitros

## LISTA DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1: Purificação da rP21 – .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>Figura 2: rP21 e a proteína nativa não apresentou toxicidade a célula MDA-MB-231 .....</b>                      | <b>24</b> |
| <b>Figura 3: Ensaio de Invasão celular .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>Figura 4: Ensaio de replicação e Multiplicação de parasitas. ....</b>   | <b>26</b> |
| <b>Figura 5: Ensaio de Migração Vertical.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>Figura 6: Imunofluorescência da célula MDA-MB-231.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>Figura 7: Citometria de Fluxo e microscopia de fluorescências. ....</b>   | <b>31</b> |
| <b>Figura 8: Avaliação dos níveis de CXCR4 na MDA-MB-231 infectada com T. cruzi por microscopia confocal. ....</b> | <b>32</b> |
| <b>Figura 9: Avaliação dos níveis de CXCR4 na MCF-10A infectada com T. cruzi por microscopia confocal .....</b>    | <b>33</b> |

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introdução</b>   | 11 |
| 1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas                              | 11 |
| 1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e Câncer  | 12 |
| 1.3 rP21   | 13 |
| 1.4 Câncer de mama   | 14 |
| <b>2. Justificativa</b>  | 16 |
| <b>3. Objetivos</b>  | 17 |
| 3.1 Geral  | 17 |
| 3.2 Específicos  | 17 |
| <b>4. Materiais e métodos</b>  | 17 |
| 4.1 Local de estudo  | 17 |
| 4.2 Normas de biossegurança  | 18 |
| 4.3 Cultura de células   | 18 |
| 4.4 Produção e purificação de rP21   | 18 |
| 4.5 Ensaio de viabilidade  | 19 |
| 4.6 Invasão e multiplicação intracelular de parasita                           | 20 |
| 4.7 Ensaio de replicação   | 20 |
| 4.8 Ensaio de migração vertical  | 21 |
| 4.9 Microscopia confocal   | 21 |
| 4.10 Citometria de fluxo   | 22 |
| 4.11 Análise estatística   | 23 |
| <b>5. Resultados</b>   | 23 |
| 5.1 Purificação da rP21  | 23 |
| 5.2 rP21 e a sua forma nativa não é citotóxica para as células tumorais        | 24 |
| 5.2 <i>T. cruzi</i> apresentou uma maior taxa de invasão em células MDA-MB-231 | 24 |
| 5.3 MCF-10A apresenta maior taxa de replicação                                 | 25 |
| 5.4 rP21 e sua forma nativa reduz a migração celular                           | 27 |
| 5.5 Tráfego intracelular da proteína rP21                                      | 28 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 5.6 | A proteína recombinante P21 e sua forma nativa é capaz de diminuir a expressão de CXCR4 ..... | 30 |
| 6.  | Discussão .....   | 33 |
| 7.  | Conclusão .....   | 36 |
| 8.  | Referências .....   | 37 |

## Resumo

Vários estudos têm demonstrado que extratos, proteínas e o próprio *Trypanosoma cruzi* tem ação na redução de tumores em modelos animais e em cultura de células. A proteína recombinante P21 de *T. cruzi* desempenha diferentes atividades biológicas como atividade quimiotática para células do sistema imunológico, inibe a angiogênese e modula negativamente a replicação do parasito. Além disso foi observado que esta proteína se liga ao receptor de quimiocina CXCR4. Assim esse estudo teve como objetivo avaliar o impacto da rP21 e da infecção por *T. cruzi* em células de câncer de mama triplo-negativo e células epiteliais não tumorais. Inicialmente realizamos o ensaio de viabilidade e foi visto que o tratamento com rP21 e a infecção por *T. cruzi* até o tempo de 72 horas, não apresentou uma viabilidade menor que 50%. Após o ensaio de viabilidade verificamos a taxa de invasão, multiplicação e eclosão de parasita no sobrenadante. A linhagem celular de mama normal, MCF-10A 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. A célula de mama triplo-negativo MDA-MB-231 também apresenta uma suscetibilidade a infecção pelo parasita. Após o tratamento com rP21 e a infecção por *T. cruzi*, notou-se a diminuição na migração de ambos os grupos tratados. Além disso observamos que a proteína rP21 após a marcação no tempo de 3 horas encontra-se localizada no núcleo da célula o que pode estar relacionada com o receptor CXCR4. Nossos resultados mostram que a expressão de CXCR4 na célula MDA-MB-231 diminui ao longo do tempo, porém apresenta uma curva de crescimento e queda na fluorescência nos tempos observados sugerindo uma translocação do receptor CXCR4 ao longo do tempo. Nas células MCF-10A a fluorescência ao longo dos tempos não apresentou diferença significativa. Quando observamos a interação da infecção do *T. cruzi* com o receptor CXCR4 vimos que ocorre uma interação entre eles nas células MDA-MB-231 e MCF-10A sugerindo uma relação entre a migração/invasão e proliferação dessas células. Em conclusão rP21 e outras moléculas do *T. cruzi* podem ser alvos potenciais para a descoberta para drogas contra o tumor.

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

## Abstract

Several studies have shown that extracts, proteins and *Trypanosoma cruzi* itself have an action in reducing tumors in animal models and in cell cultures. The recombinant protein P21 from *T. cruzi* performs different biological activities such as chemotactic activity for immune system cells, inhibits angiogenesis and negatively modulates the replication of the parasite. Furthermore, it was observed that this protein binds to the CXCR4 chemokine receptor. Thus, this study aimed to evaluate the impact of rP21 and *T. cruzi* infection on triple-negative breast cancer cells and non-tumor epithelial cells. Initially, we performed the viability test and it was seen that the treatment with rP21 and the infection by *T. cruzi* up to 72 hours, did not present a viability lower than 50%. After the viability test, we verified the rate of invasion, multiplication and hatching of the parasite in the supernatant. The normal breast cell line, MCF-10A, is susceptible to infection by *T. cruzi*, being able to provide a favorable environment for the replication and differentiation of the parasite and the release of viable infective forms. The triple-negative MDA-MB-231 breast cell is also susceptible to parasite infection. After treatment with rP21 and *T. cruzi* infection, a decrease in migration of both treated groups was noted. After treatment with rP21 and infection by *T. cruzi*, a decrease in migration of both treated groups was noted. Furthermore, we observed that the rP21 protein after 3 hours labeling is located in the cell nucleus, which may be related to the CXCR4 receptor. Our results show that the expression of CXCR4 in the MDA-MB-231 cell decreases over time, but it presents a growth curve and a decrease in fluorescence at the observed times, suggesting a translocation of the CXCR4 receptor over time. In MCF-10A cells, fluorescence over time did not show any significant difference. When we observed the interaction of *T. cruzi* infection with the CXCR4 receptor, we saw that there is an interaction between them in MDA-MB-231 and MCF-10A cells, suggesting a relationship between migration/invasion and proliferation of these cells. In conclusion, rP21 and other *T. cruzi* molecules may be potential targets for the discovery anti-tumor drugs.

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

## **1. Introdução**

### **1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas**

Descrita em 1909 por Carlos Chagas, a doença de Chagas também conhecida como tripanossomíase americana, é transmitida pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* pertencente à Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e possui três apresentações morfológicas distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota (DE SOUZA, 1984). Doença de Chagas é uma doença tropical considerada negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), endêmica em 21 países das Américas e afeta aproximadamente 6 milhões de pessoas (“Doença de Chagas - OPAS / OMS | Organização Pan-Americana da Saúde”, [s.d.]). Essa doença já foi totalmente confinada às áreas rurais da Região das Américas, principalmente da América Latina de acordo com a OMS. Porém, nas últimas décadas, devido aos movimentos populacionais, a maioria das pessoas infectadas vivem em áreas urbanas e a doença se espalhou para outros continentes, onde *T. cruzi* é transmitido por formas não vetoriais. Na América Latina, sua transmissão aos humanos ocorre principalmente pelo contato com fezes ou urina de espécies de insetos triatomíneos infectados com o parasita *T. cruzi*. Sua transmissão pode ocorrer também por transfusões sanguíneas ou transplantes de órgãos, transmissão de mãe para filho e ingestão oral de alimentos contaminados (“Doença de Chagas | DNDi América Latina”, [s.d.]). A transmissão por via oral ocorre de maneira esporádica e circunstancial, através da ingestão de alimentos contaminados por triatomíneo ou seus dejetos (DIAS, 2006).

O ciclo biológico de *T. cruzi* no triatomíneo inicia quando o inseto vetor alimenta-se de sangue humano ou animal, contendo as formas infectivas tripomastigotas sanguíneas. No estômago do triatomíneo as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e se multiplicam por divisão binária. Na porção final do intestino do inseto, as formas epimastigotas se diferenciam em formas infectantes tripomastigotas metacíclicas que serão liberadas juntamente com as fezes na próxima alimentação (DVORAK; HOWE, 1976). Através da mucosa ou ferimentos na pele o parasita entra na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e invade as células, se transformando em amastigota, que é a fase de desenvolvimento e multiplicação desse parasita. Os amastigotas podem continuar invadindo as células e se multiplicar, ou podem diferenciar em tripomastigotas (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A doença de Chagas apresenta dois estágios clínicos: aguda e crônica. Na fase aguda, a maior parte das pessoas não apresenta nenhum sintoma e quando os sintomas ocorrem

duram cerca de dois dias a quatro meses podendo ocorrer erupções de pele e nódulos inflamatórios, febre, dor de cabeça, náuseas, diarreia, vômito, dificuldade para respirar e gânglios linfáticos aumentados, sendo que nessa fase, há uma alta carga parasitária no sangue (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Durante a fase crônica, os parasitas estão principalmente no coração e no trato digestivo, onde 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e até 10% sofrem de alterações digestivas, geralmente aumento do esôfago ou cólon, alterações neurológicas ou mistas. A infecção crônica pode levar à morte súbita devido a arritmias cardíacas ou insuficiência cardíaca progressiva causada pela destruição do músculo cardíaco (BESTETTI; MUCCILLO, 1997).

### **1.2 *T. cruzi* e Câncer**

A relação *T. cruzi* e câncer vem sendo estudada desde a década de 1930 na Rússia Soviética. Nesta época Roskin, Exempliarskaia, 1931 publicou um artigo que descreveu um fenômeno interessante, a inibição mútua de tumores malignos implantados e infecção por *T. cruzi* em camundongos indicava que a infecção por *T. cruzi* poderia levar à cura do câncer (ROSKIN; EXEMPLIARSKAIA, 1931). Em 1946, os cientistas soviéticos Nina Kliueva e Grigorii Roskin descobriram que o uso de cepas de *T. cruzi* tinha efeito bioterapêutico no tratamento de carcinomas em camundongos (KLYUEVA, 1947). Uma relação antagônica entre a infecção por *T. cruzi* e o desenvolvimento do câncer também foi proposta, mas os mecanismos moleculares envolvidos permaneceram amplamente desconhecidos. Provavelmente, uma grande variedade de moléculas e mecanismos de *T. cruzi* estão envolvidos (RAMÍREZ-TOLOZA; ABELLO; FERREIRA, 2016). A compreensão desses mecanismos pode contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos contra o câncer.

A proteína J18, uma proteína recombinante baseada na molécula de superfície gp82 de *T. cruzi*, mostrou ser capaz de induzir especificamente a morte celular apoptótica de células de melanoma sem exercer qualquer efeito sobre os melanócitos normais (ATAYDE et al., 2008). Em experimentos *in vivo*, um grupo de camundongos tratados com a proteína J18 desenvolveram tumores de tamanho menor do que camundongos tratados com solução salina tamponada com fosfato (ATAYDE et al., 2008). Uma outra proteína, a calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), apresentou uma diminuição significativa em tumores de animais tratados com a proteína recombinante (rTcCRT). TcCRT é uma proteína residente no retículo endoplasmático do parasita, está envolvida em uma variedade de interações

patógenos-hospedeiro, é um fator de virulência que inibe a angiogênese (RAMÍREZ-TOLOZA; ABELLO; FERREIRA, 2016). Em outro estudo, investigaram a resposta imune protetora de extratos de *T. cruzi* contra câncer de cólon e mamário induzido quimicamente. Neste trabalho foi demonstrado que a vacinação com lisados de epimastigota de *T. cruzi* inibe fortemente o desenvolvimento dos tumores, através da indução da ativação de célula CD4 (+), CD8(+) e um número crescente de CD11b/c(+) His48(-) MHC II(+) que correspondem a macrófagos e / ou células dendríticas. Observou-se, também, a presença de anticorpos específicos para células de câncer de cólon e mama em camundongos tratados com o lisado (UBILLOS et al., 2016). *T. cruzi* além de apresentar propriedades anticâncer também é um vetor de entrega de antígenos de câncer eficaz. Um clone não patogênico recombinante de *T. cruzi* foi utilizado como um vetor de vacina para induzir imunidade mediada por células T. Os parasitas que expressam um antígeno de câncer de testículo (NY-ESO-1) foram capazes de induzir resposta de células T específicas aos antígenos tumorais *in vitro* e proteção contra melanoma em um modelo de camundongo (JUNQUEIRA et al., 2011). Portanto, proteínas secretadas por *T. cruzi* e o próprio parasita apresenta um potencial alvo para a busca de novos compostos para o tratamento do câncer.

### 1.3 rP21

A proteína P21 secretada por *T. cruzi* descoberta, sequenciada e caracterizada por Silva et al. 2019 tem aproximadamente 21 kDa é secretada por todas as formas de vida de *T. cruzi* e desempenha um papel importante na invasão celular pelas formas amastigotas e tripomastigotas. Sua forma recombinante (rP21) é uma forma que adere a células de mamíferos de maneira dose-dependente e mostrou uma atividade que regula positivamente a fagocitose em células não fagocíticas (DA SILVA et al., 2009). O papel da P21 foi investigado quanto à modulação do curso da infecção experimental em camundongos durante a fase aguda e tardia da doença (TEIXEIRA et al., 2017). Foi observado que o tratamento com a proteína rP21 mostrou uma redução na carga parasitária e na angiogênese e induziu fibrose no tecido cardíaco de camundongos infectados. A rP21 conferiu uma redução na multiplicação de formas epimastigotas, inibiu a replicação intracelular de amastigotas e modulou o ciclo celular do parasito, prendendo-o na fase G1. Com isso tais dados sugerem que a P21 controla a replicação do parasita no hospedeiro, promovendo a sobrevivência do parasita e do hospedeiro (TEIXEIRA et al., 2015).

Em modelos experimentais de inflamação crônica induzida por esponja de poliéster, a rP21 promoveu quimiotaxia de leucócitos; produção de IL-4; deposição de colágeno e inibição da formação de vasos sanguíneos (TEIXEIRA et al., 2015, 2017). Em alguns estudos, foi observado que a rP21 promove fagocitose e polimerização do citoesqueleto de actina em macrófagos murinos (RODRIGUES et al., 2012) de maneira dependente de sua ligação ao receptor de quimiocina CXCR4 e ativação da via de transdução de sinal de P13-quinase. A proteína recombinante rP21 vem demonstrado grande potencial biológico para modulação do ciclo celular do parasita, recrutamento de células do sistema imunológico, indução da polimerização do citoesqueleto de actina e atividade antiangiogênica. Essas características conferem a rP21 um grande potencial terapêutico para alvos tumorais

#### **1.4 Câncer de mama**

Câncer de mama entre as mulheres é o câncer mais comum, anualmente mais de 2,1 milhões de mulheres em todo o mundo são diagnosticadas e mais de 650.000 mulheres em todo o mundo morre dessa doença heterogênea a cada ano (VAFAIZADEH et al., 2020). O câncer de mama é uma doença causada pela multiplicação desordenada de células da mama que gera células anormais que se multiplicam formando um tumor. Existe atualmente vários tipos de câncer de mama que evoluem de diferentes formas. Alguns apresentam uma progressão rápida da doença outros uma progressão mais lenta (“Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer”, [s.d.]). Essa diferença ocorre pelas características próprias de cada tumor. Por meio de estudos genômicos, quatro subtipos intrínsecos de câncer de mama podem ser identificados: luminal A, luminal B, superexpressão de HER-2 (receptor de fator de crescimento epidérmico 2), tipo basal (PRAT et al., 2010).

O subtipo luminal tem essa denominação pois as células neoplásicas desse grupo possuem semelhanças com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as células luminais (SOTIRIOU et al., 2003). Classifica-se como luminais A os tumores que são positivas para a presença de receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP) e negativo para o receptor de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) (SOTIRIOU et al., 2003). Os tumores do subtipo luminal B em sua maioria exibem RE positivos, embora esses por sua vez sejam expressos em baixos níveis; apresenta alto índice proliferativo; está associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida (RIBELLES et al., 2013). O subtipo superexpressão de HER-2 está associado a elevada expressão da oncoproteína HER-2 mas apresenta RE e RP negativo.

Apresenta o segundo pior prognóstico em relação aos demais (RIBELLES et al., 2013). O subtipo basaloide é caracterizado morfológicamente por alto grau histológico, elevado índice mitótico, pela presença de áreas de necrose central e pelo destacado infiltrado linfocitário. Apresenta negatividade para RE, RP, HER-2 e devido à ausência dessa imunomarcagem são chamados por alguns autores de “tumor triplo negativo” (TTN) (CHEANG et al., 2008). Os carcinomas de mama triplo-negativo são neoplasias muito agressivas, mais prevalentes em mulheres jovens e atualmente não existe uma terapia direcionada (CARVALHO et al., 2010). Portanto, a busca por moléculas alvos são tão importantes para a busca de um tratamento direcionado a esse subtipo de câncer.

A formação de metástase em outros órgãos do corpo é a principal causa das mortes pelo câncer de mama portanto a busca por quimiocinas e seus receptores apresentam um papel crucial no quadro clínico, pois elas regulam a migração de células tumorais e a metástase. Portanto várias moléculas alvos são estudadas, dentre elas o receptor de quimiocina CXCR4 já observado uma alta expressão em muitos tipos de tumores sólidos (CHEN et al., 2019; MÜLLER et al., 2001; WEIGELT; PETERSE; VAN'T VEER, 2005; ZHOU et al., 2018). O CXCR4 é membro da superfamília do receptor acoplado a proteína G (GPCR) expresso em uma ampla variedade de tecidos normais, mas também é expresso em um nível aumentado nas células tumorais em comparação com as células normais (BALKWILL, 2004; COJOC et al., 2013). O ligante canônico de CXCR4 é CXCL12, também conhecido como fator 1 derivado de célula do estroma (SDF-1). Seu complexo CXCR4/CXCL12 controla a regeneração de vários órgãos e tecidos como pulmão, coração, fígado, sistema nervoso; além disso, foi relatado que a ligação de CXCL12 a CXCR4 em células tumorais de vários tipos aumenta sua proliferação tanto in vitro quanto in vivo e também aumenta a neoangiogênese associada ao tumor (COJOC et al., 2013; RM et al., 2008). O eixo CXCL12 participa na orientação da migração de células cancerosas para locais de metástase, aumento da sobrevivência de células cancerosas sob condições subótimas e no estabelecimento de uma rede de citocinas/quimiocinas promotoras de tumor (BALKWILL, 2004). Portanto, a busca por anticorpos ou inibidores do eixo SDF-1  $\alpha$ /CXCR4, mais especificamente AMD3100 (droga de molécula pequena que bloqueia a ligação do CXCR4), foi intensamente investigado, entretanto, não foi aprovado para o tratamento de câncer, mas para o transplante de medula óssea (BIANCHI; MEZZAPELLE, 2020). Outros inibidores do CXCR4 foram identificados, como ALX40-4C usado como

um inibidor de cepa X4 do HIV-1 e o BPRCX807 usado para aumentar a eficácia dos tratamentos anticâncer atuais (COJOC et al., 2013; HENDRIX et al., 2004).

Borges et. al demonstrou que células de câncer de mama triplo-negativas (MDA-MB- 231) apresentam maior expressão de CXCR4 quando comparadas com células não tumorais (MCF-10A). Quando adicionada a rP21, observou-se que a proteína é capaz de se ligar a membrana celular da MCF-10A e da MDA-MB-231, bloquear o ciclo células, prevenir a quimiotaxia e proliferação induzida por CXCL12, diminuindo a expressão de membrana do receptor concomitante com sua permanência no citoplasma celular colocalizados com a rP21. Portanto, a rP21 parece reter o receptor CXCR4 no citoplasma celular por meio da inibição de seu processo de reciclagem (BORGES et al., 2020). A rP21 apresenta características muito promissoras para ser usadas nas células de câncer de mama triplo-negativo possivelmente como um antagonista de síntese biológica para o receptor CXCR4.

## **2. Justificativa**

O câncer de mama triplo negativo representa 15% dos casos de câncer de mama no mundo. E o mais agressivo dos subtipos de cânceres de mama, apresentando um mau prognóstico, pois, as células cancerígenas desse subtipo não têm receptores de estrogênio ou progesterona e não produzem a proteína HER-2 (XIAOXIAN et al., 2017). Como as células cancerígenas não tem essas proteínas, a terapia hormonal e os medicamentos que têm como alvo o HER-2 não são úteis, portanto, cirurgias e quimioterapia individualmente ou juntas, parecem ser as únicas formas de tratamento disponível. Entretanto alguns estudos identificaram receptores como alvos para novas drogas terapêuticas (WAHBA; EL-HADAAD, 2015). Um desses receptores estudados é o CXCR4 que é altamente expresso em células de câncer de mama humano, tumores de mama maligno e metástases. Alguns antagonistas de CXCR4 foram categorizados, por exemplo, AMD3100, ALX40-4C e o BRPCX807, sendo que esse último tem um potencial clínico para o tratamento de carcinoma hepatocelular. Entretanto, esses antagonistas são substâncias quimicamente sintetizadas e que apresentam potencial de gerar efeitos colaterais se aplicadas em terapia em humanos (DORANZ et al., 2001; HENDRIX et al., 2004; SONG et al., 2021).

A busca por uma terapia contra o câncer se faz necessário, porém mais importante é a busca por terapias que não apresente efeitos colaterais, ou que tenham efeitos nocivos minimizados em suas terapias. Peptídeos e interações proteína-proteína são alvos terapêuticos em potencial.

As interações proteína-proteína são a base de essencialmente todos os processos celulares, esses processos bioquímicos são frequentemente compostos de receptores ativados que regulam indiretamente ou diretamente uma série de atividades. Drogas que se ligam especificamente a esses receptores podem atuar como agonistas ou antagonistas. (LEE et al., 2019). Mais de 60 drogas peptídicas tem alcançado o mercado e o principal contribuinte para este sucesso é o modo de ação potente e específico, mas, principalmente seguro e com poucos efeitos adversos (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). Portanto, a busca por um antagonista do CXCR4, oriundo de síntese biotecnológica como peptídeos ou proteínas recombinantes apresenta um grande potencial de sucesso para o tratamento de câncer de mama triplo- negativo. Assim, o estudo das atividades biológicas da rP21 sobre o comportamento de células tumorais de mamas com características invasivas se faz relevante, uma vez que essa proteína apresenta de forma preliminar potencial para ser antagonista de CXCR4.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Geral**

- Avaliar o impacto da infecção por *T. cruzi* em células tumorais de mama humanas, bem como nas células normais de mama, focando no papel da proteína rP21.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar a cinética de migração da rP21 em células tumorais triplo-negativas metastáticas
- Verificar a taxa de invasão de *T. cruzi* em células MDA-MB-231 em comparação com células não tumorais de mama (MCF-10A);
- Avaliar a suscetibilidade das células pela infecção;
- Avaliar o efeito do tratamento da rP21 e da infecção por *T. cruzi* na migração celular;

### **4. Materiais e métodos**

#### **4.1 Local de estudo**

Os ensaios realizados neste estudo foram feitos no Laboratório de Tripanosomatídeos pertencentes ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

## **4.2 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 (MINEO, 2005).

## **4.3 Cultura de células**

Células não tumorais de mama (MCF-10A) e células tumorais triplo-negativas metastática (MDA-MB-231) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem MCF-10A (ATCC® CRL- 10317™) foi cultivada em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com fator de crescimento epidérmico (EGF) 20 ng/mL, hidrocortisona 0,5µg/ml, insulina bovina 10 µg/mL, 5% de SFB, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina.

A linhagem MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) foi mantida em meio DMEM (Sigma-Aldrich, MO, EUA), 10% de SFB, 2 mM bicarbonato de sódio, 10 mM Hepes, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina.

Todas as células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

O tampão PBS 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. Em todos os ensaios utilizado, o PBS é diluído em 1x. O reagente PGN consiste em uma solução de salina tamponada com tampão fosfato (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).

## **4.4 Produção e purificação de rP21**

A proteína rP21 (GenBank: EU004210.1) foi purificada como descrito por (DA SILVA et al., 2009; SANTOS et al., 2014). O vetor Pet-28A (+) contendo o gene completo para a forma nativa da proteína P21 de *T. cruzi* foi transfectada em *Escheria coli* BL21. Para o pré-inóculo 200µL das bactérias BL21 foram inoculadas em 10 mL de meio LB estéril, contendo o antibiótico Kanamicina (50 µg/mL), onde foi mantido sob agitação em temperatura de 37°C até atingir a OD de aproximadamente 0,5 à 0,9. A produção da proteína recombinante é estimulada quando acrescentado ao meio o IPTG na concentração final de 1mM, manteve-se o frasco sob agitação continua por três horas. O volume total foi

centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e sedimento formado foi dissolvido em solução de ureia dissolvida em água destilada a 6M.

Em seguida, utilizou-se a Lisozima (50 mg/mL) para induzir a lise celular, na proporção de 1 µ: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 obtido 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). Logo após, 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 desenovelada 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), depois 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 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. Após a purificação, a proteína foi incubada em coluna de polimixina B. A qualidade da purificação foi demonstrada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) e a concentração da proteína foi quantificada por Bradford (Bradford, 1976).

#### **4.5 Ensaio de viabilidade**

O efeito do tratamento com rP21 ou da infecção por *T. cruzi* na viabilidade da linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 foi determinado. As células ( $1 \times 10^4$ ) foram

semeadas em placas de 96 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com 50 µg/mL de rP21 em meio sem SFB ou infectadas por tripomastigotas de cultura de tecidos da cepa Y, 20 parasitas por célula, durante 24, 48 e 72 horas. Em seguida, 10 µL de solução reveladora (resazurina 3 mM em PBS) foram adicionados a cada poço (ROLÓN et al., 2006) e a placa foi incubada novamente, por 24h, nas mesmas condições. As leituras de absorbância em 594 nm foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca (Camberra-Packard). Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores de absorbância de cada condição experimental foram utilizados para calcular a viabilidade celular de acordo com o controle. Concentrações que apresentam menos de 50% de células viáveis seriam consideradas tóxicas.

#### **4.6 Invasão e multiplicação intracelular de parasita**

1 x 10<sup>5</sup> células das linhagens MCF-10A e MDA-MB-231 foram semeadas em uma placa de cultura de 24 poços. Após 24 horas de incubação, tripomastigotas de cultura de tecidos da cepa Y de *T. cruzi* foram colocadas para invadir as células na proporção de 10 parasitas / célula. Após duas horas de infecção, as células foram lavadas com o PBS. Para o ensaio de invasão, após as duas horas de infecção as lamínulas foram fixadas com Boiun (composto por 17,4% de ácido pírico, 23,8% de formaldeído na concentração de 37,5% e 4,8% de ácido acético) por 15 minutos, e coradas com Giemsa durante 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. No ensaio de multiplicação as lamínulas foram fixadas com Bouin e coradas com Giemsa 72 horas após a infecção.

Para avaliar o ensaio de invasão celular foi analisado o número de parasitas em 300 células e realizado o cálculo da % de células infectadas. Na análise da multiplicação, o número de parasitas internalizados em um total de 300 células infectadas foi contado. Em todas as contagens foi utilizado microscópio de luz na objetiva de 100X com óleo de imersão.

#### **4.7 Ensaio de eclosão de parasitas no sobrenadante**

As células MCF-10A e MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 24 poços (1x10<sup>5</sup> células/poço), contendo lamínulas circulares de 13mm. As células foram incubadas overnight para adesão a lamínula. No dia seguinte foram infectadas com TCT da cepa Y na

proporção 10 parasitas por 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.

#### **4.8 Ensaio de migração vertical**

Ensaio de migração foi feito usando *transwells* com poros 8  $\mu$ m (Costar, Corning, Estados Unidos da América). A câmara superior continha células no meio de cultura ( $1 \times 10^5$ /mL) e a câmara inferior continha o meio de cultura (controle negativo) ou 20 ng/mL CXCL12 (quimioatraente). Em um grupo, as células foram pré-tratadas com 50  $\mu$ g/ml rP21; em outro as células foram infectadas 1h antes com *T. cruzi* e em seguida, adicionadas na câmara superior. As células foram incubadas por 6 h a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. As células não migradas foram removidas 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 usando o *software ImageJ*.

#### **4.9 Microscopia confocal**

Para determinar a localização e o tráfego da rP21,  $1 \times 10^5$  de células MDA-MB-231 foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 13 mm (Knittel) em placas de 24 poços em cada poço. No outro dia, as células foram tratadas com 50  $\mu$ g/mL de rP21. O primeiro grupo após 1h de tratamento as células foram lavadas com PBS e fixadas. Os demais grupos após 3h de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas em diferentes momentos ou teve o meio repostado até o momento da fixação da célula nos tempos de 3, 6, 9, 24, 48, 72 horas pós-tratamento. As células foram fixadas com formaldeído a 4% por 1 hora e lavadas três vezes com PBS. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-rP21 (1:10) diluído em PGN a 0,1% de saponina *overnigh* a 4 °C. No outro dia, as células foram lavadas com PBS, incubadas com IgG de coelho anti-camundongo conjugado com FITC (diluído 1: 200) e TOPRO (coloração nuclear) por 1 hora. Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas e montadas utilizando o antifadín 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).

A distribuição do receptor CXCR4 foi analisada usando o anti-CXCR4 1:200 (SIGMA, Estados Unidos). Ambas as células foram plaqueadas em placa de 24 poços com lamínulas de vidro de 13 mm (Knittel). Posteriormente as células foram tratadas com 50 µg/mL de rP21, nos tempos de 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas foram fixadas, lavadas e incubadas com o anticorpo primário e PGN, não foi usado PGN saponina pois o intuito era analisar a presença do receptor CXCR4 na membrana da célula. No outro dia, as células foram lavadas com PBS, incubadas com Anticorpo anti-rabbit Alexa Fluor 594 1:500 (Life Technologies, Estados Unidos) por 1 hora. As lâminas foram montadas e visualizadas no microscópio de fluorescência confocal e as imagens obtidas nas objetivas de 40x e 63x (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha).

Para determinar a interação do *T. cruzi* com CXCR4 de células MCF-10A e MDA-MB-231 elas foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço), contendo lamínulas circulares de 13mm. Em seguida, as células foram infectadas com *T. cruzi* cepa Y, na proporção de 20 parasitos por célula durante duas horas. Depois, as células foram lavadas com PBS e fixadas em diferentes momentos (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas pós-incubação). 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 mais 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 (diluído 1:200), Alexa Fluor 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 63x.

#### **4.10 Citometria de fluxo**

Para determinar os níveis de CXCR4 após tratamento com rP21 em diferentes tempos, as células foram cultivadas em placas de 24 poços tratadas com rP21 nos tempos de 1h, 3h, 6h, 9h, 12h e 24h. Após cada tempo as células foram tripsinizadas, fixadas com paraformaldeído 4% por pelo menos 1h, marcadas com anticorpo Anti-CXCR4 1:200 (SIGMA, Estados Unidos). As células foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e o anticorpo secundário Anticorpo anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Life Technologies, Estados Unidos) foi diluído em 1:500. Os dados de 12.000 células

foram coletados por um CytoFLEX (Beckman Coulter). Os resultados foram obtidos usando o software Kaluza (Beckman Coulter). As intensidades médias de fluorescência (MFI) foram calculadas usando a mediana das amostras em uma escala logarítmica.

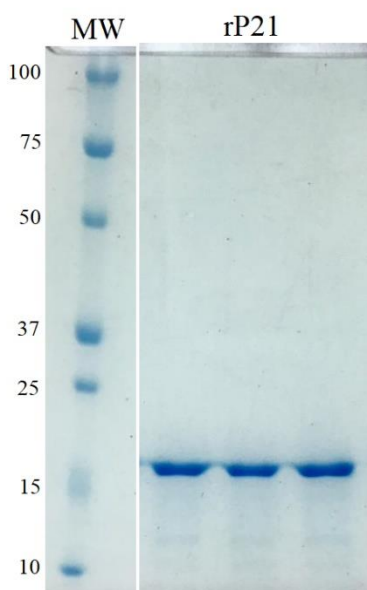
#### **4.11 Análise estatística**

Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão dos experimentos realizados pelo menos três vezes em triplicatas. Todos os dados foram primeiro verificados quanto à distribuição normal. Os ensaios quantitativos foram comparados por meio de análise de variância simples (One way ANOVA), análise de variância dupla classificação com erro padrão (Two way ANOVA), comparações múltiplas de Tukey e teste t de Student para dados paramétricos ou o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos de acordo com o desenho experimental.  $P < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prisma versão 8.0.

### **5. Resultados**

#### **5.1 Purificação da rP21**

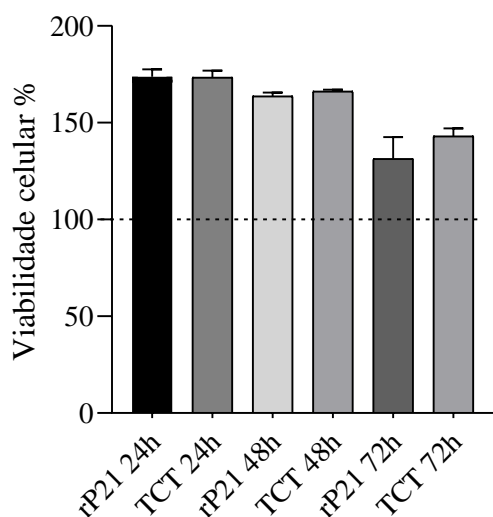
Utilizando a técnica de cromatografia de afinidade por coluna de níquel e diálise contra PBS, já determinado por Silva et al, 2009, a purificação da proteína rP21 foi realizada. A presença e a pureza da proteína foram verificadas usando gel de poliacrilamida a 13%, e a concentração verificada usando o método de Bradford (DA SILVA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012).



**Figura 1: Purificação da rP21** – Gel de poliacrilamida a 13% mostrando a pureza da rP21 obtido por meio da fração insolúvel dos corpos de inclusão de bactérias. À esquerda, o peso molecular, a direita a banda correspondente a 3 dosagens de proteína de aproximadamente 18 kDa, rP21.

## 5.2 rP21 e a infecção por *T. cruzi* não foram citotóxicos para as células tumorais nos tempos analisados

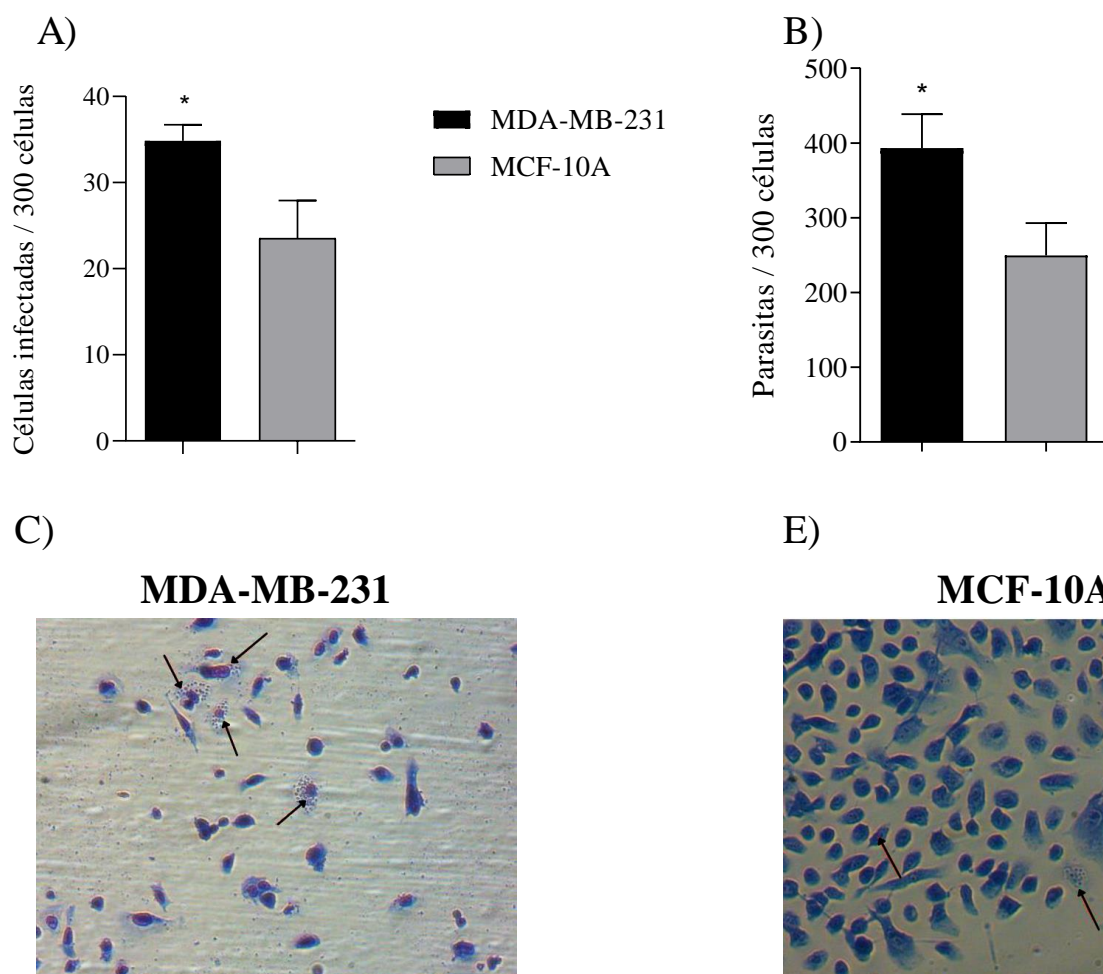
A fim de verificar se a rP21 e a infecção por *T. cruzi* possuem ação tóxica na linhagem celular MDA-MB-231, as células foram submetidas ao tratamento com a concentração de 50 µg/mL de rP21 e infecção por *T. cruzi* cepa Y. De acordo com os resultados obtidos pelo ensaio com resazurina, a proteína e *T. cruzi* não foram citotóxicos para a célula (Figura 2).



**Figura 2: rP21 e a infecção por *T. cruzi* não apresentaram toxicidade a célula MDA-MB-231.** Um grupo de células foram tratadas com 50 µg/mL e outro infectado com *T. cruzi* pelo tempo de 24, 48 e 72h horas.

## 5.2 *T. cruzi* apresentou uma maior taxa de invasão em células MDA-MB-231

A linhagem MDA-MB-231 apresentou maior número de célula infectadas quando comparada com a MCF- 10A (Figura 3A). Quando observamos a quantidade de parasitas em 300 células a linhagem MDA-MB-231 também apresentou uma taxa mais elevada (Figura 3B).



**Figura 3: Ensaio de Invasão celular.** As linhagens celulares MCF-10A e MDA-MB-231 foram plaqueadas e infectadas com *T. cruzi* cepa Y. Após duas horas de infecção foram fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. **A)** Quantidade de células infectadas em 300 células totais. **B)** Quantidade de *T. cruzi* em 300 células totais. **C-D)** Imagem representativa de MDA-MB-231 e MCF-10A respectivamente. Coloração com Giemsa. Imagens obtidas com o microscópio Nikon Ti-S com aumento de 20x. Em ambas as imagens as setas pretas indicam as células infectadas. A diferença estatística foi calculada utilizando o teste T e valores de  $p < 0,01$  foram considerados significativos.

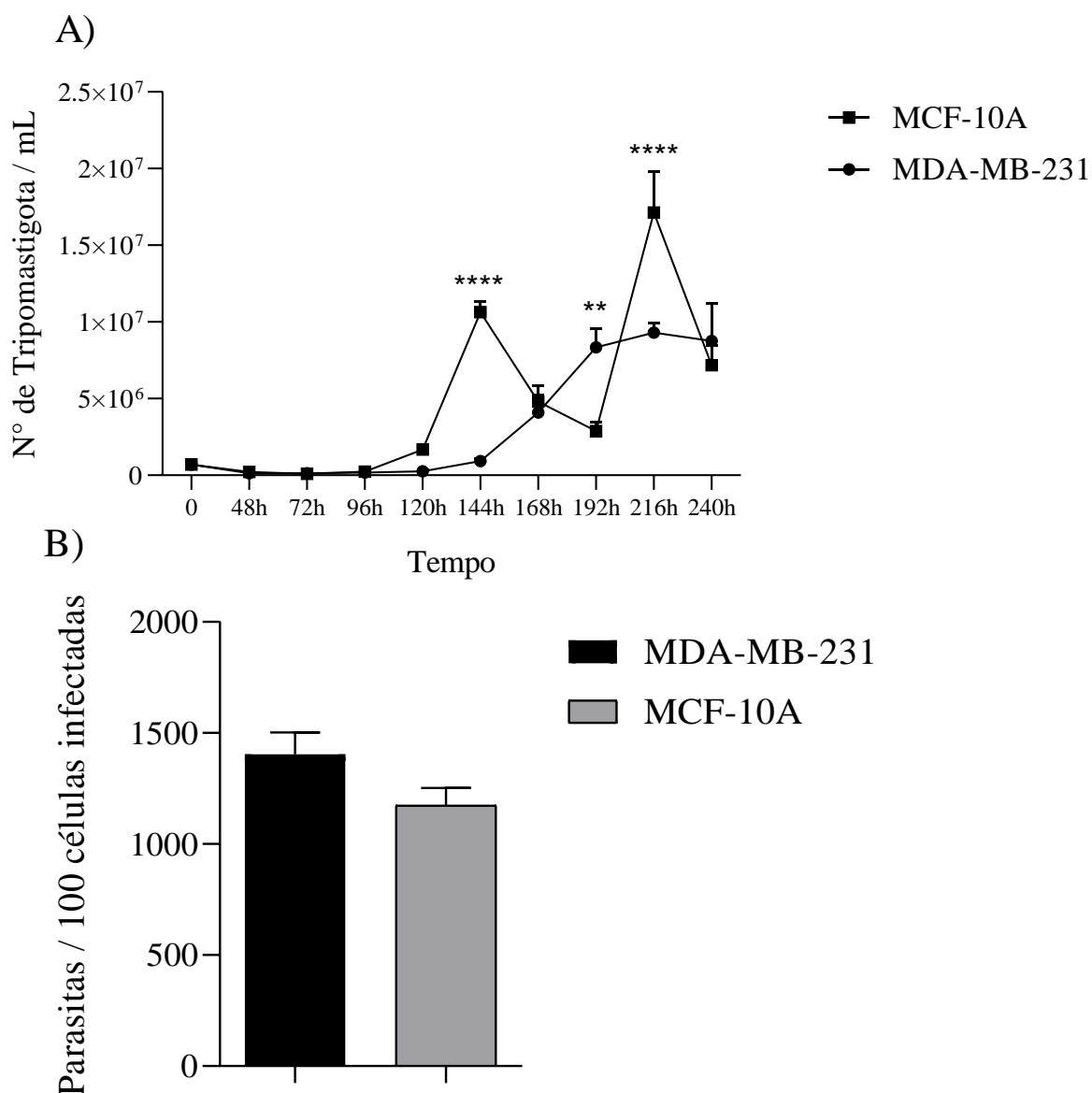
### 5.3 MCF-10A apresenta maior taxa de eclosão de parasitas no sobrenadante

A taxa de eclosão do parasita foi analisada por meio da contagem do número de tripomastigotas liberados no sobrenadante. Diariamente, era realizada essa contagem até o 10º dia. Observamos que ocorreu a liberação muito maior de formas tripomastigotas por MCF-10A do que por MDA-MB-231 (Figura 4-A).

No tempo de 144 horas foi observado uma liberação de um grande número de tripomastigotas no sobrenadante da célula MCF-10A, seguido por uma queda desse número no tempo de 168 horas. Ao longo do tempo observado, a célula MCF-10A apresentou um padrão de queda e crescimento com o pico maior no tempo de 168 horas.

Quando observamos a linhagem tumoral, ocorre um crescente aumento no número de tripomastigotas no sobrenadante sem uma queda significativa ao longo do experimento.

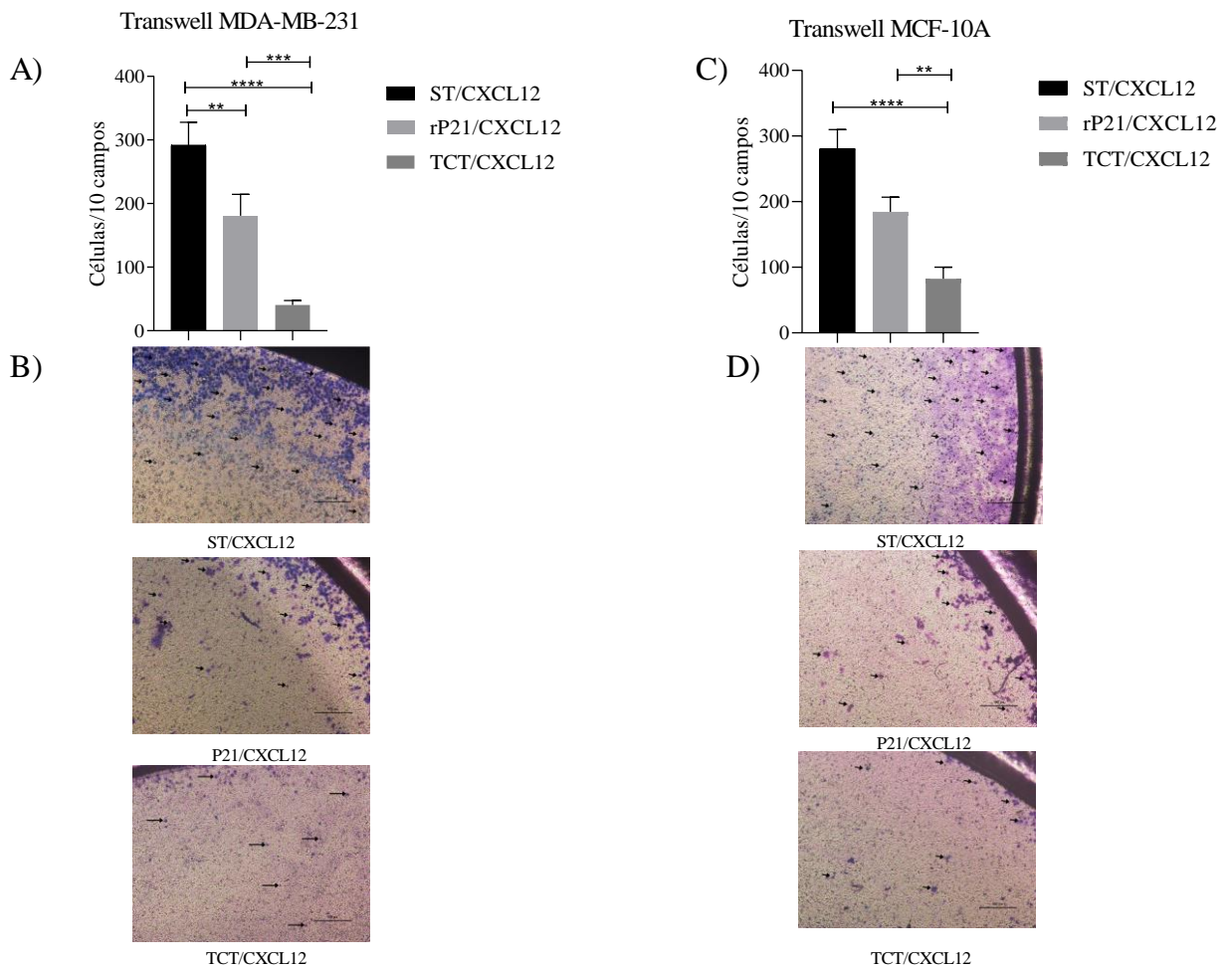
No ensaio de multiplicação não houve diferença estatística entre as duas células (Figura 4-B). A suscetibilidade da linha celular MDA-MB-231 à infecção por *T. cruzi* nos direcionou para a realização do ensaio de migração celular.



**Figura 4: Ensaio de eclosão e Multiplicação de parasitas** A) MCF-10A e MDA-MB-231 foram plaqueadas, e no dia seguinte foram infectadas com 10 parasitas por células. O número de tripomastigotas viáveis liberado no sobrenadante foi avaliado por 9 dias em câmara de Neubauer, todo dia após o segundo dia de infecção. A diferença estatística foi calculada usando Two way ANOVA, os valores de  $p < 0,01$  foram considerados significativos. B) MCF-10A e MDA-MB-231 foram plaqueadas, infectadas com 10 parasitas por células. Após 72 horas de infecção, foram fixadas e coradas. A diferença estatística foi calculada utilizando o teste T e valores de  $p < 0,01$  foram considerados significativos.

#### 5.4 rP21 e infecção por *T. cruzi* reduzem a migração celular

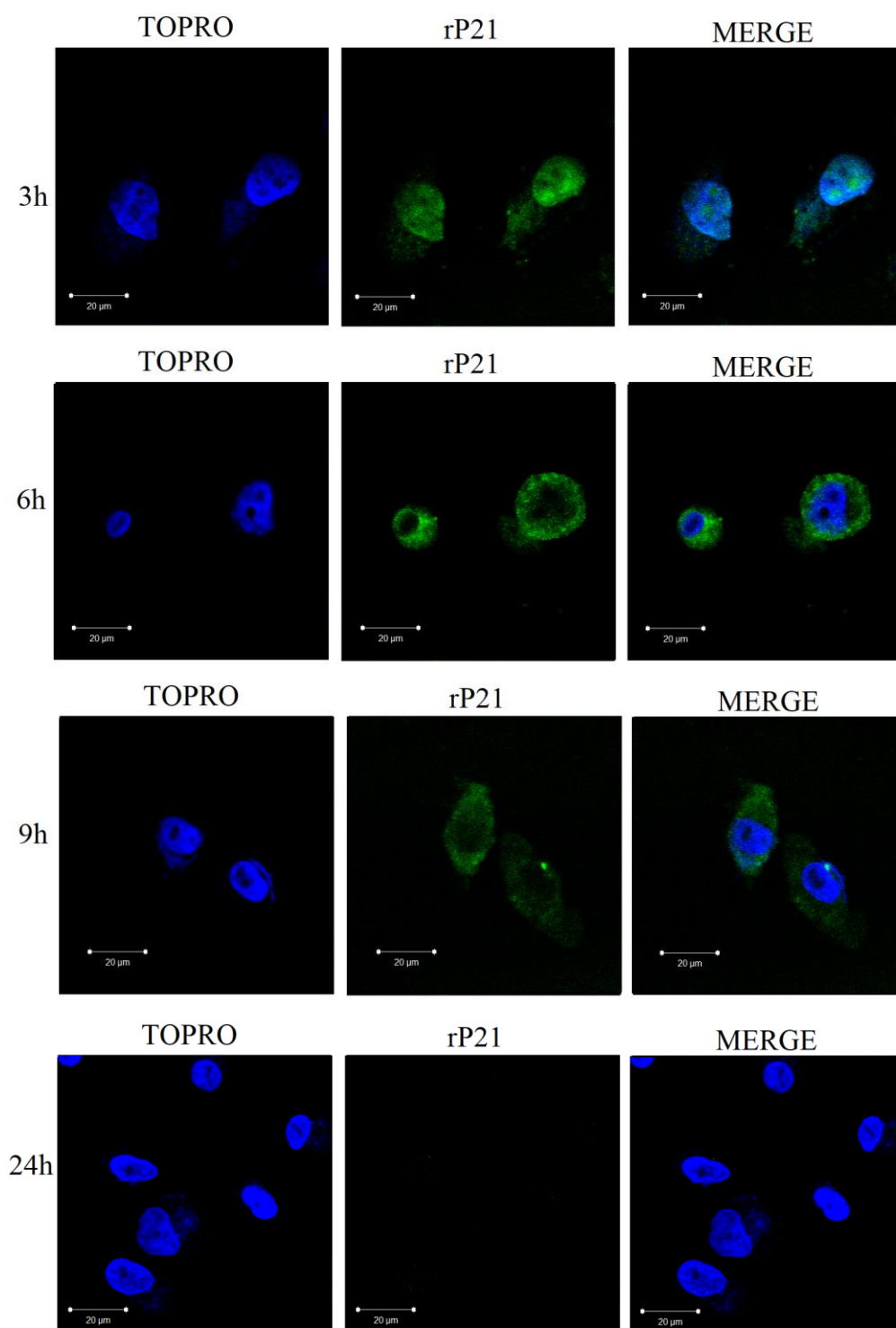
No ensaio de migração vertical utilizando os transwells foi visto que a presença da rP21 ou do parasita é capaz de diminuir a migração tanto nas células MCF-10A quanto nas células MDA-MB-231 quando comparada ao controle positivo. Ao observar os resultados estatísticos, as células MDA-MB-231 apresentaram uma diferença estatística entre o controle e o tratado com rP21 e *T. cruzi*. Quando analisada a linhagem celular MCF-10A, observamos apenas uma diferença significativa do não tratado quando comparado ao infectado com o parasita (Figura 5).



**Figura 5: Ensaio de Migração Vertical.** As células foram incubadas com seus respectivos tratamentos, rP21 ou células infectadas com *T. cruzi*. A câmara superior do transwell foi adicionado os grupos tratados ou infectados e não tratados e a câmara inferior continha meio de cultura (controle negativo) ou 20 ng/mL CXCL12 (quimiotraente). As células foram incubadas por 6 horas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> e a capacidade migratória dessas células foram avaliadas através de uma membrana de polycarbonato presente em um sistema *transwell*. As imagens foram usadas para contar o número de células usando o *software ImageJ*. **A-B)** Gráfico e imagens representativas do ensaio de migração *transwell* da célula MDA-MB-231. **C-D)** Gráfico e imagens representativas do ensaio de migração *transwell* da célula MCF-10A.

### **5.5 Tráfego intracelular da proteína rP21**

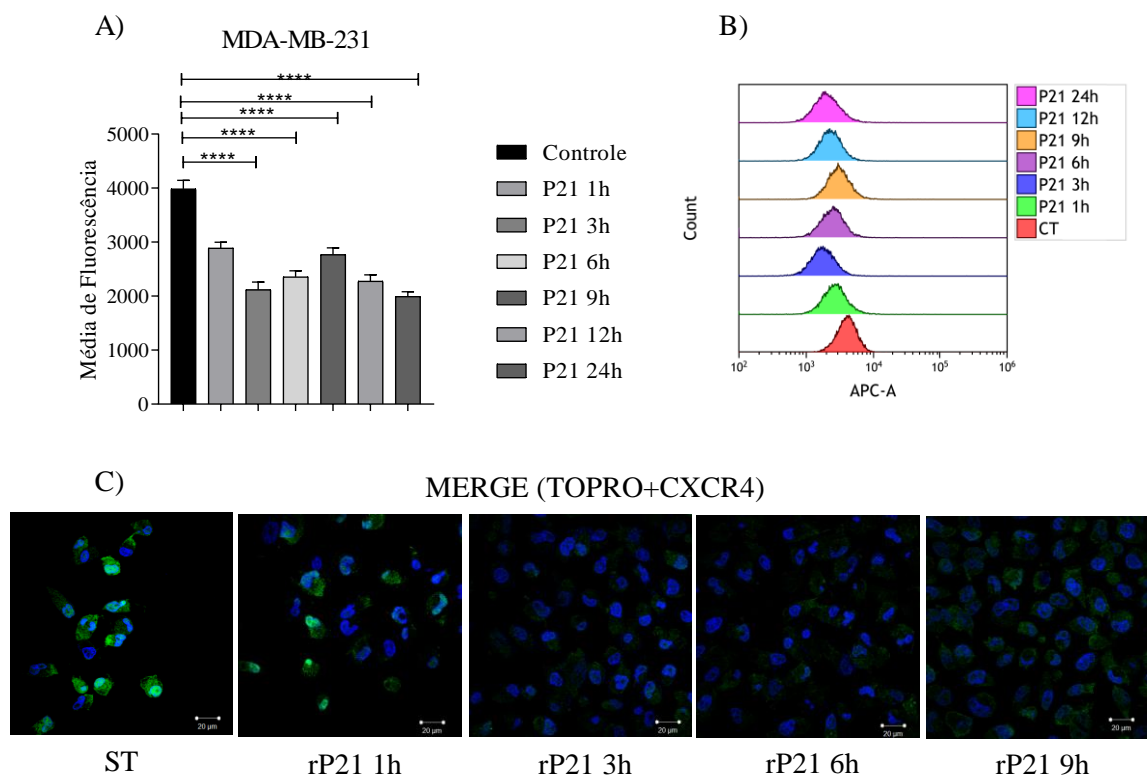
Ao longo dos tempos foi observado uma diminuição na fluorescência além da distribuição da rP21 no citoplasma celular ao longo dos tempos. No tempo de 3 horas ocorre uma forte marcação da rP21 sobreposto a região do núcleo; em 6 horas uma marcação da rP21 na delimitação da célula seguindo com o tempo de 9 horas apresentando uma marcação mais fraca até a ausência de marcação no tempo de 24 horas (Figura 6).

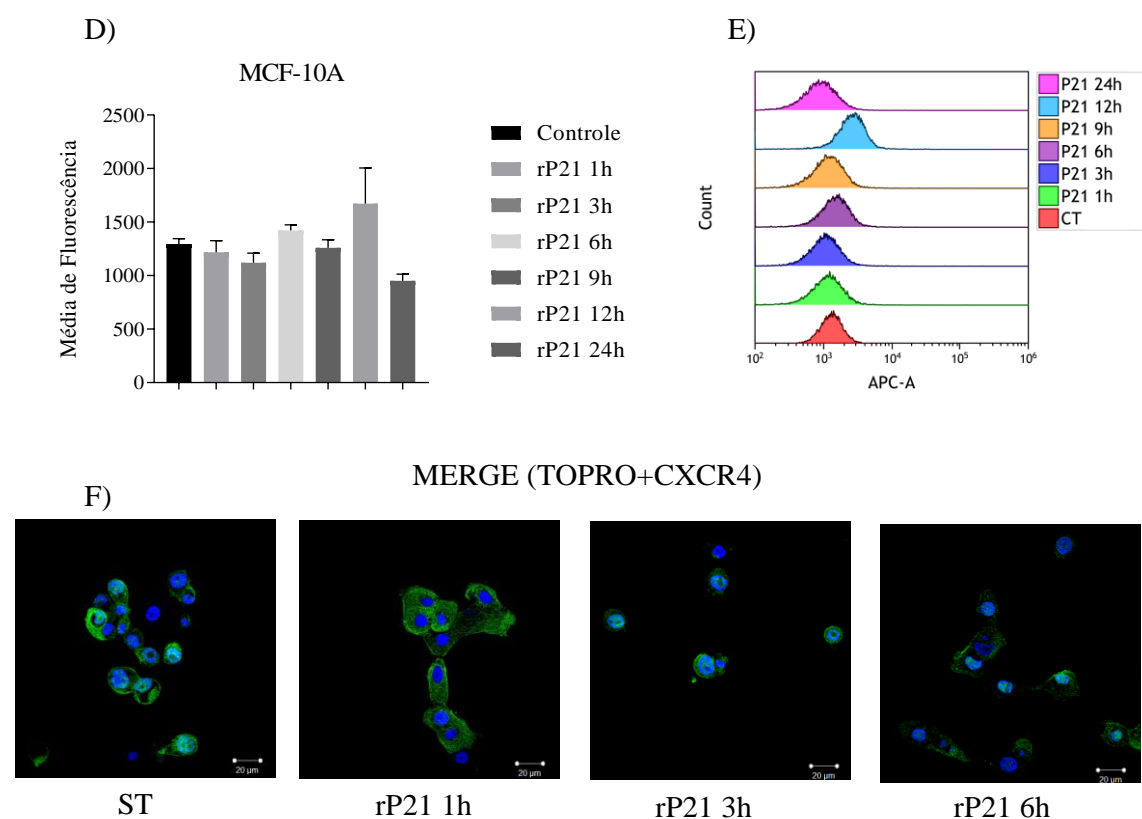


**Figura 6: Imunofluorescência da célula MDA-MB-231.** Localização da rP21 nas células MDA-MB-231 realizada através da marcação com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-rP21 (1:10) em verde, diluído em PGN a 0,1% de saponina durante 12 horas a 4 °C e com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com FITC (diluído 1: 200) e TOPRO (coloração nuclear em azul) por 1 hora. As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência confocal e as imagens obtidas nas objetivas de 40x e 63x (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha).

### 5.6 A proteína recombinante P21 e a infecção por *T. cruzi* são capazes de diminuir a expressão de CXCR4 na membrana plasmática

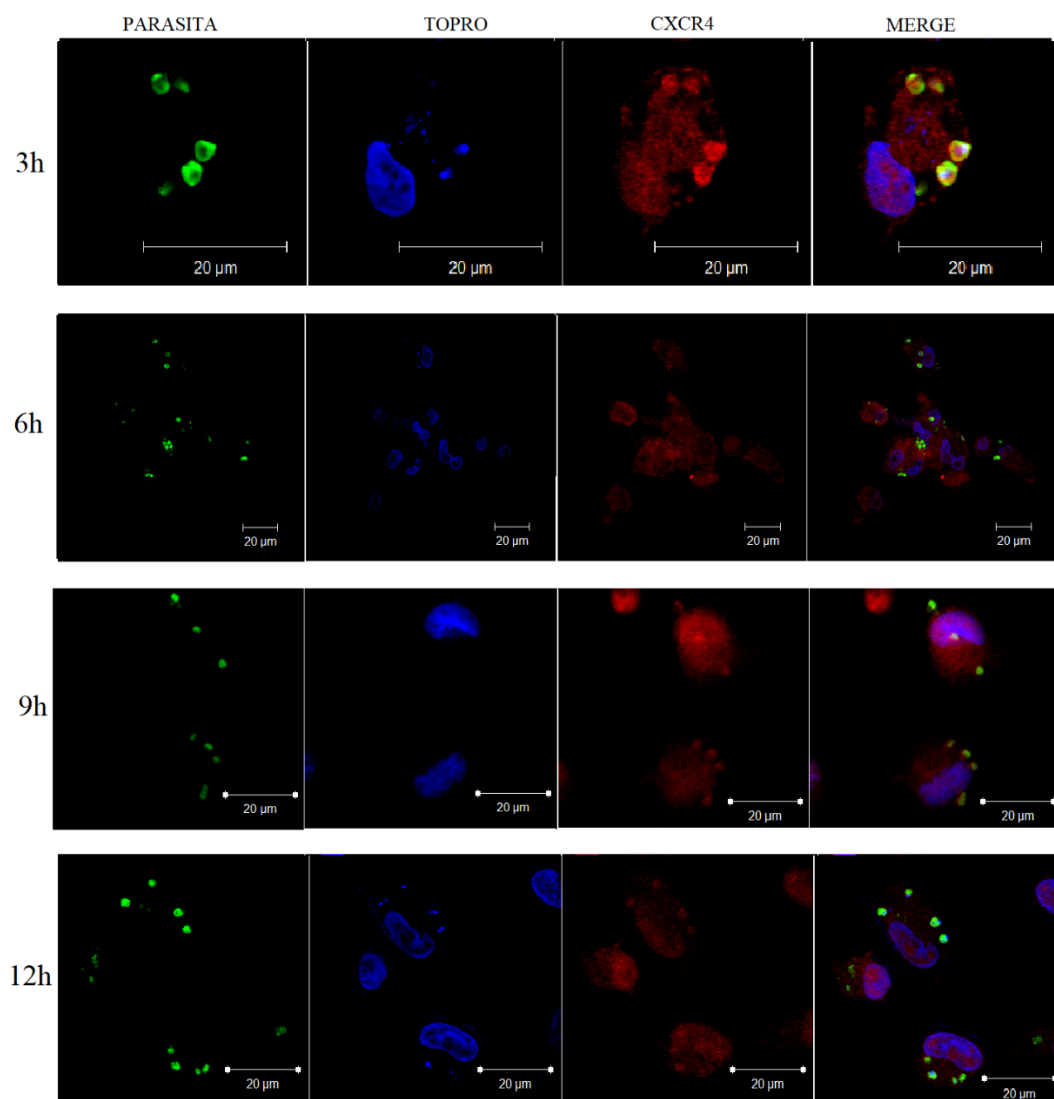
Os resultados mostraram que a expressão de CXCR4 na célula MDA-MB-231 diminuiu ao longo do tempo, entretanto observou-se uma curva de crescimento e queda na fluorescência nos tempos observados sugerindo que pode estar ocorrendo uma translocação do receptor CXCR4 ao longo do experimento (Figura 7 A-C). Nas células MCF-10A a fluorescência ao longo dos tempos não apresentou diferença significativa em relação ao controle, sem tratamento com a rP21 (Figura 7 D-F).



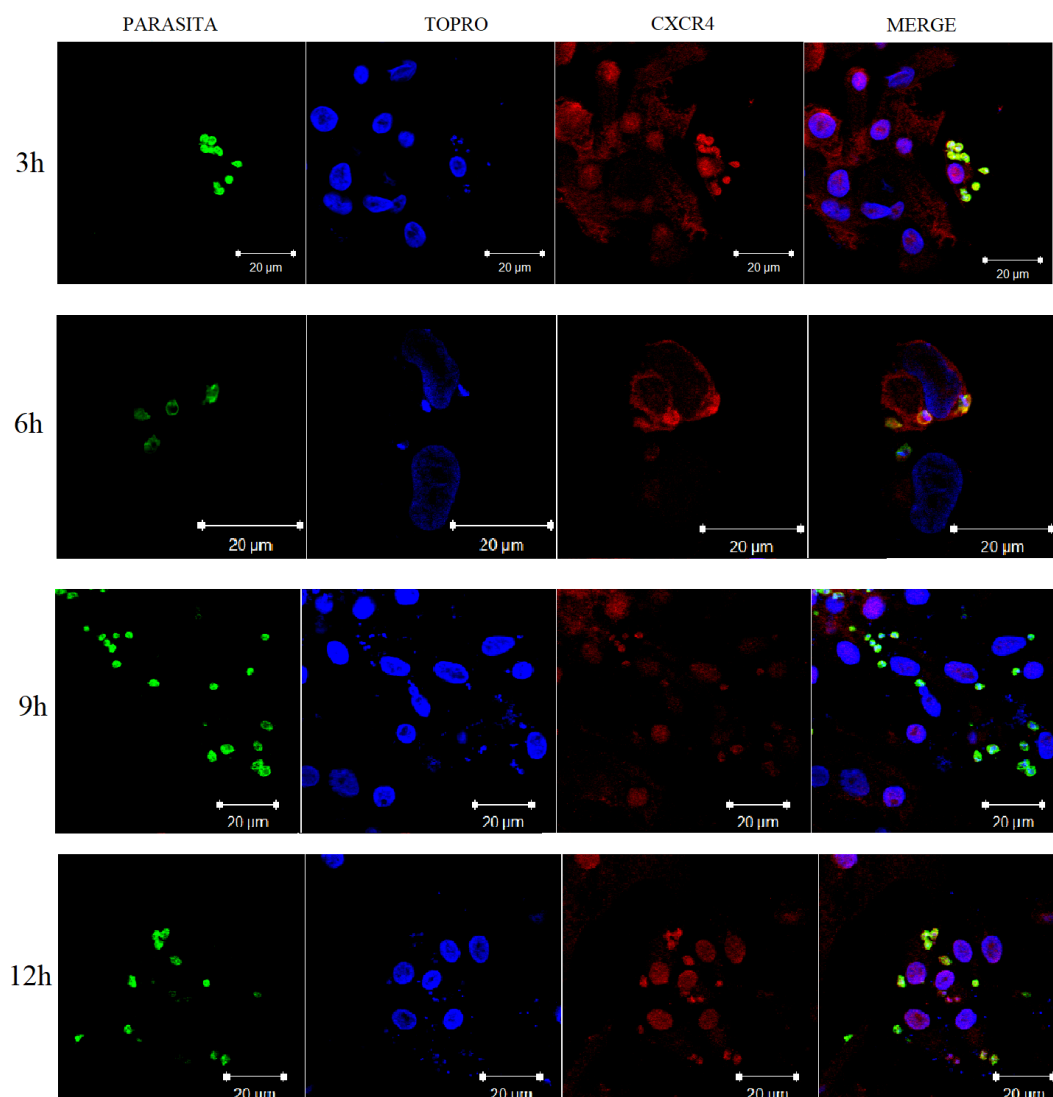


**Figura 7: Citometria de Fluxo e microscopia de fluorescências.** A-B) Análise por citometria de fluxo de intensidade média de fluorescência da marcação para o CXCR4 nas células MDA-MB-231 após tratamento com rP21 nos tempos de 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas. Os dados sugerem que o tratamento com a rP21 na célula diminuem a fluorescência em relação ao grupo não tratado e que ocorre uma translocação de CXCR4 ao longo do tempo. C) Imunofluorescência das células MDA-MB-231, marcação do CXCR4 com fitc (verde) e nuclear com TOPRO (azul). D-E) Análise por citometria de fluxo de intensidade média de fluorescência da marcação para o CXCR4 nas células MCF-10A após tratamento com rP21 nos tempos de 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas. Os dados sugerem que o tratamento com a rP21 não apresenta diferença significativa quando comparada com o controle. F) Imunofluorescência das células MCF-10A marcação do CXCR4 com fitc (verde) e nuclear TOPRO (azul).

Observamos uma concentração de CXCR4 entorno do parasita, evidenciando a interação *T. cruzi*/CXCR4 na célula MDA-MB-231 (Figura 8-9). Nossos dados sugerem que ocorre uma interação entre *T. cruzi* e o receptor CXCR4 nas células MDA-MB-231 e MCF-10A sugerindo uma relação entre a migração/invasão dessas células.



**Figura 8: Avaliação dos níveis de CXCR4 na MDA-MB-231 infectada com *T. cruzi* por microscopia confocal.** Imunofluorescência das células MDA-MB-231 nos tempos de 3, 6, 9, 12h após a infecção do parasita com marcação do CXCR4 em vermelho, parasita em verde e marcação nuclear em azul. As células foram marcadas com anticorpo primário anti-CXCR4 (diluído 1:100) e soro chagásico humano (diluído 1:500) durante a noite a 4° C. No dia seguinte foram incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 568 (diluído 1:200), Alexa Fluor 488 (diluído 1:200) e TOPRO (coloração nuclear 1:200). As lâminas foram analisadas por microscopia confocal. As imagens foram obtidas em microscópio Zeiss LSM 510 META com aumento de 63X.



**Figura 9: Avaliação dos níveis de CXCR4 na MCF-10A infectada com *T. cruzi* por microscopia confocal.** Imunofluorescência das células MCF-10A nos tempos de 3, 6, 9, 12h após a infecção do parasita com marcação do CXCR4 em vermelho, parasita em verde e marcação nuclear em azul. As células foram marcadas com anticorpo primário anti-CXCR4 (diluído 1:100) e soro chagásico humano (diluído 1:500) durante a noite a 4° C. No dia seguinte foram incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 568 (diluído 1:200), Alexa Fluor 488 (diluído 1:200) e TOPRO (coloração nuclear 1:200). As lâminas foram analisadas por microscopia confocal. As imagens foram obtidas em microscópio Zeiss LSM 510 META com aumento de 63X.

## 6. Discussão

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama em 2020 foi diagnosticado em mais de 2,2 milhões de casos sendo o câncer que mais atinge pessoas no mundo seguido pelo câncer de pulmão. No Brasil o câncer de mama é o mais incidente em mulheres, apresentando maiores taxas nas regiões Sul e Sudeste (INCA., 2021). O tratamento para o câncer de mama pode ser dividido em duas modalidades, o tratamento

local que consiste na cirurgia e radioterapia além da reconstrução mamaria (MORAN et al., 2014). E o tratamento sistêmico, quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica que será baseado de acordo com o risco de recorrência assim como, das características tumorais que ditarão a terapia mais apropriada (GIULIANO et al., 2011). Já foi demonstrado que lisados do *T. cruzi*, vacinação utilizando o próprio parasita como vetor de antígenos tumorais é a própria infecção por *T. cruzi* e proteínas do parasita possuem ação preventiva e redução de tumores (UBILLOS et al., 2016; RAMÍREZ- TOLOZA; ABELLO; FERREIRA, 2016; JUNQUEIRA et al., 2011) A interação entre câncer e *T. cruzi* vem sendo estudada na Rússia Soviética desde a década de 1930 porém até os dias atuais não foi totalmente elucidada as propriedades biológicas do *T. cruzi* que atuam nas células de câncer e sua interação. Portanto investigamos o seu comportamento célula/parasita em células não tumorais e tumorais de mama. A linhagem MDA-MB-231 ao analisar a porcentagem de células infectadas pela *T. cruzi* observamos uma maior porcentagem de célula infectadas quando comparada com a MCF-10A. A linhagem celular de mama normal apresenta maior taxa de eclosão de parasitas no sobrenadante, seguido por tempos de baixo número de tripomastigota. Uma menor taxa de tripomastigota estar correlacionado a um acúmulo de formas amastigotas (TYLER; ENGMAN, 2001). Portanto, a queda no número de parasita pode estar correlacionada com uma grande formação de ninhos de amastigotas durante estes momentos. Nossos resultados mostram que essa linhagem celular MCF-10A 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. Em comparação a célula MDA-MB-231 apresentou uma crescente liberação de tripomastigotas ao longo do tempo estudado, porém em uma quantidade menor que a MCF- 10A. Algumas células como monócitos humanos, macrófagos, HeLa, Hep2 e CRL-1718 (astrócitos da linhagem humana) são altamente suscetíveis à infecção por *T. cruzi* (VARGAS-ZAMBRANO et al., 2013; WILLIAMS; REMINGTON, 1977). Por outro lado, as células Vero são menos suscetíveis a infecção, apenas 1-8% das células pós-infecção (p.i) se encontra infectadas em uma proporção de 1:10 de parasitas por células, usando diferentes cepas de *T. cruzi* (PIRES et al., 2008). Da mesma forma, célula do músculo esquelético do embrião bovino (BESM) exibe uma taxa de infecção de 1-4% com condições de cultura semelhantes (DVORAK; HOWE, 1976). Macrófagos são células fagocitárias que apresentam uma maior sobrevivência à infecção por *T. cruzi* quando comparada com células não fagocíticas e são altamente suscetíveis à

infecção. Porém, quando infectados em uma proporção de 1:10 de parasitas eles são destruídos (TANOWITZ et al., 1975).

Os tratamentos atuais para o câncer de mama se baseia nos tipos de receptores encontrado presente nas células cancerígenas tais como receptores hormonais, receptor de estrogênio e progesterona ou o receptor HER-2 (fator de crescimento epidérmico 2) (HAMMOND et al., 2010). Entretanto câncer de mama caracterizado como triplo negativo não apresenta tais receptores o que problematiza a utilização de terapias baseadas nesses receptores. Nesse sentido, o CXCR4 figura como um potencial alvo terapêutico para vários tipos de tumores (ZHOU et al., 2018). O receptor CXCR4 liga-se principalmente à quimiocina CXCL12 e está amplamente distribuído em várias células do organismo, principalmente, em células progenitoras de medula óssea e leucócitos e desempenha diversas funções importantes como o estímulo à sobrevivência, a proliferação e quimiotaxia celular (BALKWILL, 2004; COJOC et al., 2013). A interação CXCL12/CXCR4 em células tumorais de mama, muitas vezes, ocasionam uma maior proliferação dessas células onde são conduzidas pelo gradiente de concentração CXCL12 que pode promover metástase do tumor de mama (TEICHER; FRICKER, 2010). 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. Um exemplo dessa interação é a ciclofosfamida, que possui a capacidade 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., 2017). CXCL12 quimiocina que se liga a este receptor, induz a resposta quimiotática e proliferação celular (TANAKA et al., 2005). Diante disto, mesmo com a presença do quimioatraente CXCL12, no ensaio de transwell, observamos que as células tratadas com rP21 e infectadas com o *T. cruzi* teve a sua migração afetada em ambas as células.

A proteína recombinante P21 já demonstrou apresentar propriedades anti-angiogênicas *in vitro* e *in vivo* (TEIXEIRA et al., 2017) e demonstrou ser capaz de se ligar ao receptor CXCR4 e regular negativamente sua expressão na membrana plasmática (BORGES et al., 2020). O mesmo efeito foi visto ao longo da cinética de tratamento na célula MDA-MB-231 quando tratada com 50 µg/mL de rP2. Observou-se uma curva de crescimento e queda na fluorescência sugerindo que pode estar ocorrendo uma translocação do receptor CXCR4. Além disso quando observamos a marcação da rP21 nesta mesma célula vimos

uma localização da rP21 em sobreposição ao núcleo da célula que pode estar relacionado com o receptor CXCR4. Já foi demonstrado que o CXCR4 migra para o núcleo da célula e essa migração é um indicativo para um mau prognóstico para diferentes tipos de câncer (BAO et al., 2019; SPEETJENS et al., 2009).

Algumas proteínas do *T. cruzi* já foram estudadas e apresentaram propriedade anti-tumoral como é o exemplo da calreticulina proteína de 45 kDa, que interagem com o componente C1 da via clássica do sistema complemento (MICHALAK et al., 2009). Além disso a forma recombinante da calreticulina inibe o crescimento de adenocarcinoma mamário e de melanoma em diferentes modelos animais experimentais, além de apresentar propriedades antiangiogênica em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (AGUILAR-GUZMÁN et al., 2014; LÓPEZ et al., 2010; MOLINA et al., 2005). Ambos, a infecção por *T. cruzi* e o tratamento com rP21, interferiram na migração celular e na expressão do receptor CXCR4. No entanto, a correlação entre a localização rP21/CXCR4 ou parasita/CXCR4 e seu impacto na migração celular ainda precisa de mais estudos.

## 7. Conclusões

Em conclusão as linhagens celulares MDA-MB-231 e a MCF-10A são susceptíveis a infecção por *T. cruzi*, e a célula MCF-10A mostrou um ambiente propício a uma maior proliferação das formas amastigota e conseqüentemente uma maior liberação das formas tripomastigotas no sobrenadante. Ambas as linhagens celulares quando infectadas por *T. cruzi* ou tratadas com rP21 tiveram sua migração impedida. O receptor CXCR4 se acumula ao redor de *T. cruzi* ao longo da cinética de invasão celular. Em ambas as linhagens celulares foi observado que o receptor CXCR4 durante a cinética de tratamento com a rP21 apresenta uma diminuição da sua expressão de membrana. Tendo em vista todo o potencial para a busca por novos alvos terapêuticos para o tratamento de câncer de mama e outros tipos de câncer, a proteína recombinante P21 e outras moléculas de *T. cruzi* podem ser alvos potenciais.

## 8. Referências

- AGUILAR-GUZMÁN, L. et al. Human Survivin and Trypanosoma cruzi Calreticulin Act in Synergy against a Murine Melanoma In Vivo. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95457, 22 abr. 2014. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0095457
- ATAYDE, V. D. et al. A recombinant protein based on Trypanosoma cruzi surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. **Melanoma Research**, v. 18, n. 3, p. 172–183, jun. 2008. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3282feeaab
- BALKWILL, F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, n. 3, p. 171–179, 1 jun. 2004. DOI: 10.1016/j.semcancer.2003.10.003
- BAO, Y. et al. A feed-forward loop between nuclear translocation of CXCR4 and HIF-1 $\alpha$  promotes renal cell carcinoma metastasis. **Oncogene**, v. 38, n. 6, p. 881–895, 7 fev. 2019. DOI: 10.1038/s41388-018-0452-4
- 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. DOI: 10.1016/S0167-5273(97)00083-1
- BIANCHI, M. E.; MEZZAPELLE, R. The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tissue Regeneration. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 2109, 28 ago. 2020. DOI: 10.3389/FIMMU.2020.02109
- 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. 8, n. October, p. 1–11, 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.569729
- CARVALHO, F. M. et al. Triple-negative breast carcinomas are a heterogeneous entity that differs between young and old patients. **Clinics**, v. 65, n. 10, p. 1033–1036, 2010. DOI: 10.1590/S1807-59322010001000019
- CHEANG, M. C. U. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1368–1376, 1 mar. 2008. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1658
- CHEN, I. X. et al. Blocking CXCR4 alleviates desmoplasia, increases T-lymphocyte infiltration, and improves immunotherapy in metastatic breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 10, p. 4558–4566, 5 mar. 2019. DOI:

10.1073/PNAS.1815515116

COJOC, M. et al. **Emerging targets in cancer management: Role of the CXCL12/CXCR4 axis** *OncoTargets and Therapy* Dove Press, , 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3794844/>. Acesso em: 27 jun. 2021 DOI: 10.2147/OTT.S36109

DA SILVA, C. V. et al. Characterization of a 21 kDa protein from Trypanosoma cruzi associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 563–570, abr. 2009. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.03.007

DE SOUZA, W. Cell Biology of Trypanosoma cruzi. **International Review of Cytology**, v. 86, n. C, p. 197–283, 1 jan. 1984. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)60180-1

DIAS, J. C. P. Notes about of Trypanosoma cruzi and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 370–375, 2006. DOI: 10.1590/S0037-86822006000400010

**Doença de Chagas - OPAS / OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>. Acesso em: 24 jun. 2021.

**Doença de Chagas | DNDi América Latina**. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em: 24 jun. 2021.

DORANZ, B. J. et al. Safe use of the CXCR4 inhibitor ALX40-4C in humans. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 17, n. 6, p. 475–486, 2001. DOI: 10.1089/08892220151126508

DVORAK, J. A.; HOWE, C. L. The Attraction of Trypanosoma cruzi to Vertebrate Cells In Vitro. **The Journal of Protozoology**, v. 23, n. 4, p. 534–537, 1 nov. 1976. DOI: 10.1089/08892220151126508

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Accepted Manuscript Title: Peptide therapeutics: Current status and future directions Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.10.003

GIULIANO, A. E. et al. Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 305, n. 6, p. 569–575, 9 fev. 2011. DOI: 10.1001/JAMA.2011.90

HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p. 2784, 1 jun. 2010. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.6529

HENDRIX, C. W. et al. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 37, n. 2, p. 1253–1262, 1 out. 2004. DOI: 10.1097/01.qai.0000137371.80695.ef

HUNG, C.-M. et al. Cyclophosphamide promotes breast cancer cell migration through CXCR4 and matrix metalloproteinases. **Cell biology international**, v. 41, n. 3, p. 345–352, 1 mar. 2017. DOI: 0.1002/CBIN.10726

**Incidência | INCA - Instituto Nacional de Câncer.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/dados-e-numeros/incidencia>>.

Acesso em: 14 out. 2021.

JUNQUEIRA, C. et al. Trypanosoma cruzi as an effective cancer antigen delivery vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 49, p. 19695, 6 dez. 2011. DOI: 10.1073/PNAS.1110030108

KLYUEVA, N. Pathes of cancer biotherapy. **American review of Soviet medicine**, v. Jun;4(5), p. 408–14, 1947. DOI: 10.1590/S0104-59702009000500005

LEE, A. C.-L. et al. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, 2 maio 2019. DOI: 10.3390/IJMS20102383

LÓPEZ, N. C. et al. Antiangiogenic and antitumor effects of trypanosoma cruzi Calreticulin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. e730, jul. 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000730

Marek, M. et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. **The Biochemical journal**, v. 417, n. 3, p. 651–666, 1 fev. 2009. DOI: 10.1042/BJ20081847

MINEO, J. R. MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA EM PESQUISA NA ÁREA BIOMÉDICA. In: **SciELO Books**. Uberlândia: [s.n.]. p. 81–111. DOI: 10.7476/9788570785237.0005

MOLINA, M. C. et al. An in vivo role for Trypanosoma cruzi calreticulin in antiangiogenesis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 140, n. 2, p. 133–140, 2005. DOI: 10.1016/J.MOLBIOPARA.2004.12.014

MORAN, M. S. et al. SSO-ASTRO Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery with Whole Breast Irradiation in Stage I and II Invasive Breast Cancer. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 88, n. 3, p.

553, 1 mar. 2014. DOI: 0.1016/J.IJROBP.2013.11.012

MÜLLER, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50–56, 1 mar. 2001. DOI: 10.1038/35065016

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. **Chagas disease****The Lancet**Lancet Publishing Group, , 6 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28673423/>>. Acesso em: 24 jun. 2021 DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4

PIRES, S. F. et al. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 3–4, p. 289–297, mar. 2008. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.08.013

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. 1–18, 2 set. 2010. DOI: 10.1186/bcr2635

RAMÍREZ-TOLOZA, G.; ABELLO, P.; FERREIRA, A. Is the Antitumor Property of *Trypanosoma cruzi* Infection Mediated by Its Calreticulin? **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JUL, p. 1, 11 jul. 2016. DOI: 10.3389/FIMMU.2016.00268

RIBELLES, N. et al. Pattern of recurrence of early breast cancer is different according to intrinsic subtype and proliferation index. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 5, p. R98, 22 out. 2013. DOI: 10.1186/bcr3559

RM, T. et al. The chemokine receptor CXCR4 is expressed in pancreatic intraepithelial neoplasia. **Gut**, v. 57, n. 11, p. 1555–1560, nov. 2008. DOI: 10.1136/GUT.2007.143941

RODRIGUES, A. A. et al. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51384, 10 dez. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0051384

ROLÓN, M. et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 103–107, 28 jul. 2006. DOI: 10.1007/s00436-006-0126-y

ROSKIN, G.; EXEMPLIARSKAIA, E. Protozoeninfektion und experimenteller Krebs - I. Mitteilung. **Zeitschrift für Krebsforschung**, v. 34, n. 1, p. 628–645, jan. 1931. DOI: 10.1007/BF01625403

SONG, J. S. et al. A highly selective and potent CXCR4 antagonist for hepatocellular carcinoma treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 13, 30 mar. 2021. DOI: 10.1073/pnas.2015433118

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression

profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10393–10398, 2 set. 2003. DOI: 10.1073/pnas.1732912100

SPEETJENS, F. M. et al. Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients. **Cancer Microenvironment**, v. 2, n. 1, p. 1–7, jan. 2009. DOI: 10.1007/s12307-008-0016-1

TANAKA, T. et al. **Chemokines in tumor progression and metastasis** *Cancer Science* John Wiley & Sons, Ltd, , 1 jun. 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1349-7006.2005.00059.x>>. Acesso em: 14 jun. 2021 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2005.00059.x

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, 1975. DOI: 10.4269/AJTMH.1975.24.25

TEICHER, B. A.; FRICKER, S. P. **CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer** *Clinical Cancer Research* Clin Cancer Res, , 1 jun. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20484021/>>. Acesso em: 14 jun. 2021 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2329

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, n. 1, p. 1–14, 21 mar. 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, n. 1, p. 16877, 17 nov. 2015. DOI: 10.1038/srep16877

**Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 4 jul. 2021.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, 1 maio 2001. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00153-9

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, 1 abr. 2016. DOI: 10.1002/IJC.29910

VAFSAZADEH, V. et al. **Editorial: Perspectives in Mammary Gland Development and**

**Breast Cancer Research**Frontiers in Cell and Developmental BiologyFrontiers Media S.A., , 25 ago. 2020. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 27 jun. 2021 DOI: 10.3389/fcell.2020.00719

WAHBA, H. A.; EL-HADAAD, H. A. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. **Cancer Biology & Medicine**, v. 12, n. 2, p. 106, 1 jun. 2015. DOI: 10.7497/J.ISSN.2095-3941.2015.0030

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN'T VEER, L. J. **Breast cancer metastasis: Markers and models**Nature Reviews CancerNat Rev Cancer, , ago. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16056258/>>. Acesso em: 27 jun. 2021 DOI: 10.1038/nrc1670

XIAOXIAN, L. et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 161, n. 2, p. 279–287, 1 jan. 2017. DOI: 10.1007/S10549-016-4059-6

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, 1 abr. 2018. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.009