

|                                                                                   |                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p align="center"> <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA –<br/>Campus Uberlândia</b><br/><br/> <b>INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ICBIM</b><br/><br/> <b>LABORATÓRIO DE TRIPANOSOMATÍDEOS – LATRI</b> </p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

GIOVANNA APARECIDA DOMINGUES DE OLIVEIRA

**EXTRATOS SOLÚVEIS DE EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*  
 MODULAM A MIGRAÇÃO, PROLIFERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE  
 CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA TRIPLO NEGATIVAS.**

UBERLÂNDIA

2022

GIOVANNA APARECIDA DOMINGUES DE OLIVEIRA

**EXTRATOS SOLÚVEIS DE EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*  
MODULAM A MIGRAÇÃO, PROLIFERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE  
CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA TRIPLO NEGATIVAS.**

Projeto de pesquisa submetido à avaliação da disciplina de  
TCC II do curso de Biomedicina da Universidade Federal  
de Uberlândia

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Coorientador (a): Bruna Cristina Borges

UBERLÂNDIA

2022

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Giovanna Aparecida Domingues de Oliveira

Extratos solúveis de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* modulam a migração, proliferação e multiplicação de células tumorais de mama triplo negativas.

Trabalho de conclusão de Curso  
apresentado como pré-requisito para  
obtenção de título de Bacharel em  
Biomedicina pelo curso de Biomedicina da  
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Coorientador (a): Dra. Bruna Cristina Borges

**Data:** 24/10/2022

### BANCA EXAMINADORA

**MSc. Joed Pires de Lima Jr.**

Doutorando em Imunologia e Parasitologia Aplicadas — UFU  
Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução  
Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM

---

**MSc. Guilherme de Souza**

Doutorando em Imunologia e Parasitologia Aplicadas — UFU  
Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução  
Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM

## **AGRADECIMENTOS**

Começo agradecendo a pessoa que sempre lutou pelos meus estudos e acreditou na minha vaga da faculdade, minha mãe!

Aos meus irmãos, é imensurável o meu amor e gratidão por tanto que ajudaram a me manter de pé para continuar. Aos meus tios, pai, minha sobrinha linda, cunhadas e primos, eu agradeço a todo o carinho sempre emanado!

Aos amigos de longas datas Leo, Camila, Luca, Fefe, Sil, Lucas e Gabi, segurar a mão de vocês, compartilhar histórias, choros e alegrias resultou para que todo esse trabalho acontecesse.

Aos amigos que Uberlândia me deu, Anna, Mika, Higor, Dani, Camila, Isabelle, Totoria, Renata, Fran e mais tantos, vocês tornaram minha estadia muito mais colorida e tornaram tudo muito mais fácil, obrigada por conselhos, comidas, festas, trabalhos, choros e por tanto amor!

Aos amigos do LATRI, Nelsa, Anna, Cassiano obrigada pelo acolhimento e por possibilitarem um ambiente de trabalho muito mais colaborativo. Aos amigos, Guilherme e Samuel, gratidão pela disponibilidade e disposição com os experimentos. Ao professor Claudio, sou demasiadamente agradecida a oportunidade, pois me recebeu sem delongas ao laboratório e sempre me incentivou a novas coisas. E a Bruna, eu serei eternamente grata pela generosidade de aceitar ser minha coorientadora e ter toda a paciência para me ajudar e ensinar em todos os processos, me fez crescer profissionalmente e pessoalmente, além dela ter sido minha amiga em incontáveis momentos.

Às pessoas que passaram brevemente pela minha vida e que de uma forma ou de outra me ajudaram e despertaram a minha vontade de ir além, eu sou grata.

À instituição de fomento FAPEMIG, pela concessão da bolsa.

E por fim, dedico esse trabalho à minha madrinha/tia/mãe, Eia, que infelizmente, não está mais aqui, mas que me apoiou com o maior carinho do mundo e até planejou uma “festinha” quando eu finalizasse tudo isso.

## RESUMO

Os carcinomas de mama triplo negativos são conhecidos por apresentarem um perfil tumoral agressivo, com altas taxas de metástases e de difícil prognóstico. Na busca por elementos antitumorais, surpreendentemente, microrganismos incluindo *Trypanosoma cruzi* e algumas de suas proteínas desempenham atividades antiproliferativas e antimetastáticas em células tumorais de mama, como por exemplo, a proteína P21. Frente a isso, este trabalho teve por objetivo analisar os efeitos de extratos solúveis (ES) de formas epimastigotas de *T. cruzi*, sendo eles selvagens (WT), nocautes para o gene da P21 (P21/KO) e controle da técnica de silenciamento (Cas9), nas respostas de quimiotaxia e proliferação celular das células triplo negativas de câncer de mama. Epimastigotas foram lisados por congelamento/descongelamento coletando o ES, que foi avaliado quanto ao seu perfil proteico por método de Bradford e técnica de separação eletroforética. Quanto as células cancerígenas, realizou-se testes de viabilidade celular com tratamentos por ES em ensaios bioquímicos com Resazurina; ensaio de quimiotaxia das células por *Transwell* quando estimuladas pelos ES; ensaios de formação de colônias e análise de mitose por imunofluorescência após os tratamentos com extratos solúveis. Aplicou-se testes de diferenças estatísticas e a significância dos dados aconteceu quando  $p < 0,05$ . Observou-se que, os extratos apresentaram perfis de banda, aparentemente, parecidos entre si; o tratamento com os ES manteve as células viáveis, além de mediar negativamente a migração, formação de colônias e mitose das células MDA-MB-231; houve resultados diferentes entre os grupos WT e P21/KO, notando que a ausência da P21 modula positivamente os processos clonogênicos e mitóticos. Portanto, demonstrou-se a capacidade dos extratos evitarem, fenotipicamente, a progressão tumoral, além de notar a potencialidade da P21 em mediar respostas antitumorais. Ademais, este trabalho sustenta estudos futuros, a nível biomolecular, para elucidar o mecanismo de ação dos extratos solúveis de epimastigotas em células tumorais.

**Palavras chaves:** Protozoário; CRISPR/Cas9; Antitumoral; P21

## ABSTRACT

Triple-negative carcinomas are known to have an aggressive tumor profile, with high rates of sameness and a difficult prognosis. In the search for antitumor elements, surprisingly, microorganisms including *Trypanosoma cruzi* and some of its functions play antiproliferative and antimetastatic activities in breast tumor cells, such as the P21 protein. Therefore, this work aimed to analyze the effects of soluble extracts (ES) of epimastigote forms of *T. cruzi*, being wild (WT), knockouts for the P21 gene (P21/KO), and control of the silencing technique (Cas9), in the chemotaxis and negative cell responses of triple breast cancer cells. Epimastigotes were lysed by freeze/thaw collecting ES, which was evaluated for its protein profile by Bradford's method and electrophoretic separation technique. As for cancer cells, cell viability tests were performed with treatments by ES in biochemical assays with Resazurin; cell chemotaxis assays by Transwell when stimulated by ES; colony formation assays, and mitosis analysis by immunofluorescence after treatments with soluble extracts. Statistics tests were applied, and the significance of the data occurred when  $p < 0.05$ . It was observed that the different band profiles, possibly like each other; treatment with ES maintained as viable cells, in addition to mediating directing migration, colony formation, and mitosis of MDA-MB-231; there were different results between the WT and P21/KO groups, note that the absence of P21 positively modulates clonogenic and mitotic processes. Therefore, the ability of extracts to phenotypically promote tumor progression should be avoided, in addition to noting the potential of P21 in mediating antitumor responses. Furthermore, this work supports future studies, at the biomolecular level, to elucidate the mechanism of action of soluble extracts of epimastigotes on tumor cells.

**Keywords:** Protozoan; CRISPR/Cas9; antitumor; P21

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Fatores Prognósticos em Câncer de mama do Consenso do Colégio Americano de Patologistas.

**Figura 2:** Eletroforese de separação por SDS-PAGE de extratos proteicos da forma epimastigota de *T. cruzi*.

**Figura 3:** Médias com erro padrão dos ensaios de viabilidade de células tumorais de mama tratadas com extratos solúveis.

**Figura 4:** Médias com erro padrão de células/campo em ensaio de migração celular.

**Figura 5:** Médias com erro padrão de índices das formações de colônias após os tratamentos.

**Figura 6:** Médias com erro padrão de índices mitóticos após 24 horas de tratamento.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |                                                                                    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono                                                                 |
| Cas9            | Epimastigotas controles da técnica de silenciamento CRISPR/cas9                    |
| CT              | Controle                                                                           |
| DMEM            | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio de Águia Modificado por Dulbecco). |
| ES              | Extratos Solúveis                                                                  |
| G418            | Geneticin <sup>TM</sup> Selective Antibiotic                                       |
| HER2            | Receptor de crescimento epidérmico humano 2                                        |
| J18             | Forma recombinante da glicoproteína de superfície do parasita, gp82                |
| LIT             | <i>Liver Infusion Tryptose</i> (Tryptose de Infusão de Fígado)                     |
| OMS             | Organização Mundial da Saúde                                                       |
| P21/KO          | Epimastigotas nocautes para o gene P21                                             |
| PBS             | Solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2                                       |
| pH              | Potencial hidrogeniônico                                                           |
| PGN             | pbs + gelatina + azida                                                             |
| rP21            | P21 recombinante                                                                   |
| SFB             | Soro fetal bovino                                                                  |
| TcCRT           | Chaperona molecular calreticulina                                                  |
| TN              | Triplo negativa                                                                    |

WT                      Epimastigotas *Wild Type* (selvagem)

## SUMÁRIO

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                    | 12 |
| 1.1 Câncer de mama: aspectos gerais.....                                               | 12 |
| 1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                                     | 14 |
| 1.3 Impactos dos componentes de protozoários no tratamento de câncer.....              | 14 |
| 1.4 P21 de <i>Trypanosoma cruzi</i> : aspectos gerais e sua relação com câncer de mama | 15 |
| 2. JUSTIFICATIVA.....                                                                  | 16 |
| 3. OBJETIVOS.....                                                                      | 17 |
| 3.1 Objetivo geral.....                                                                | 17 |
| 3.2 Objetivos específicos.....                                                         | 17 |
| 4. METODOLOGIA .....                                                                   | 17 |
| 4.1 Cultura celular .....                                                              | 17 |
| 4.2 Parasitos.....                                                                     | 17 |
| 4.3 Preparo dos extratos solúveis (ES).....                                            | 18 |
| 4.4 Dosagem de proteínas totais dos extratos solúveis .....                            | 18 |
| 4.5 Purificação da proteína rP21 .....                                                 | 19 |
| 4.6 Eletroforese dos extratos solúveis .....                                           | 20 |
| 4.7 Análise de viabilidade celular .....                                               | 20 |
| 4.8 Perfil quimiotático dos extratos solúveis.....                                     | 21 |
| 4.9 Ensaio clonogênico.....                                                            | 21 |
| 4.9 Ensaio mitótico.....                                                               | 22 |
| 4.10 Análise estatística.....                                                          | 22 |
| 5. RESULTADOS.....                                                                     | 23 |
| 5.1 Gel de eletroforese e dosagem de proteínas .....                                   | 23 |

|     |                                                |    |
|-----|------------------------------------------------|----|
| 5.2 | Ensaio de viabilidade celular.....             | 24 |
| 5.3 | Perfil quimiotático dos extratos solúveis..... | 24 |
| 5.4 | Ensaio clonogênico.....                        | 25 |
| 5.5 | Ensaio mitótico.....                           | 26 |
| 6.  | DISCUSSÃO.....                                 | 27 |
| 7.  | CONCLUSÃO .....                                | 29 |
| 8.  | REFERÊNCIAS.....                               | 30 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer de mama: aspectos gerais

Os tumores (neoplasias) de modo geral são conglomerados celulares provenientes de divisões celulares aceleradas, controladas ou não, benignas ou malignas. Os tumores malignos ou câncer, são caracterizados por evidenciar mitoses anormais e apresentar formato pouco delimitado, podendo o tumor desenvolver *in situ*, isto é a má formação celular no tecido em que se desenvolveu, ou apresentar caráter invasivo, em que as células cancerosas invadem outros tecidos – nesse estágio há processos angiogênicos e inflamatórios acentuados para o desenvolvimento tumoral (INCA, 2020).

E os principais tratamentos para certos tipos de câncer são as quimioterapias, contudo, pacientes oncológicos relatam sentimentos desagradáveis como fraqueza e enjoos ao serem submetidos a essas terapias (TESTON et al., 2018). Na pesquisa clínica para potenciais quimioterápicos é importante verificar a eficácia do tratamento nas células tumorais, avaliando por exemplo o papel do quimioterápico quando células estão dispostas em colônias, potencial antiproliferativo, entre outros aspectos (AYOUB et al., 2021; YANG et al., 2021).

O câncer de mama, anualmente, é diagnosticado em mais de 2,2 milhões de mulheres (IARC, 2020). No Brasil, durante o período de 2016-2020, dados de mortalidade por câncer, mostra que o de mama é o primeiro entre as mulheres, mulheres (INCA, 2020). O câncer de mama em quatro divisões de acordo com suas particularidades moleculares, de diagnóstico e tratamento, sendo categorizados como: Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo Negativo (ROSSONI et al., 2020).

Os carcinomas de mama Triplo Negativo (TN) são observados com maior frequência em pacientes do sexo feminino com idade inferior a 50 anos, apresentando perfil tumoral agressivo com diminuição da sobrevida das mulheres quando comparado aos outros subtipos (ROSSONI et al., 2020). Além disso, estes tumores não apresentam receptores de estrogênio, progesterona e não tem aumento da proteína HER2, dificultando o tratamento tumoral devido à falta de alvos moleculares (MEDINA et al., 2020). Além disso, os carcinomas TN são os tipos de câncer mamário com maior taxa de metástases, processo que consiste no desprendimento das células tumorais seguido da migração para outras regiões onde formarão novos tumores, sobretudo para o pulmão (30,8%), ossos (12,8 %) e cérebro (12,8 %) (MARTINS et al., 2017).

Para melhor manejo clínico dos pacientes com carcinoma TN, fatores preditivos e prognósticos são avaliados para assim delinear melhores terapias no tratamento do tumor (BUITRAGO et., 2011). O Colégio Americano de Patologistas em reunião de consenso classificou os fatores prognósticos em três grupos, sendo a categoria I fatores comprovadamente de importância prognóstica e úteis na prática clínica, categoria II são fatores extensivamente estudados, mas com importância ainda a ser validada e a categoria III todos os outros fatores a serem estudados para demonstrar seu valor prognóstico (FITZGIBBONS et al., 2000).

**Figura 1:** Fatores Prognósticos em Câncer de mama- Consenso do Colégio Americano de Patologistas.

|                    |                                               |
|--------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Categoria 1</b> | Estadiamento TNM                              |
|                    | Tipo histológico                              |
|                    | Grau histológico                              |
|                    | Contagem de mitose                            |
|                    | Estado de receptores hormonais                |
| <b>Categoria 2</b> | HER2                                          |
|                    | MIB1                                          |
|                    | Invasão vascular linfática                    |
|                    | P53                                           |
|                    | DNA fração S                                  |
|                    | Ploidia de DNA                                |
| <b>Categoria 3</b> | Angiogenese tumoral                           |
|                    | Receptor para fator de crescimento epidérmico |
|                    | Fator de crescimento $\alpha$                 |
|                    | BCL-2                                         |
|                    | P52                                           |
|                    | Catepsina D                                   |

Fonte: Buitrago et al., (2011)

## **1.2 *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, causador etiológico da doença popularmente conhecida como doença de Chagas. Ele é transmitido através das fezes do inseto vetor da subfamília *Triatominae* ou comumente chamado de “barbeiro”. *T. cruzi* possui três formas evolutivas bem definidas, sendo elas a epimastigota, que possui flagelo e é a forma replicativa - por divisão binária - encontrada no sistema digestório do mosquito e pode ser cultivada em meios experimentais que mimetizam o trato digestório dos Triatomíneos. Em condições estressantes a forma epimastigota se diferencia em tripomastigota metacíclico (metaciclogênese). A forma tripomastigota, é flagelada e infectante às células hospedeiras de vertebrados e, ao se disseminar na corrente sanguínea se instala nos tecidos e se diferencia na forma amastigota, forma arredondada e altamente replicativa (CHAGAS, 1909; JANSEN et al., 2020)

A doença de Chagas é composta de duas fases clínicas, a fase aguda (habitualmente assintomática) e a fase crônica, que pode ser assintomática e sintomática. A fase sintomática crônica é grave e principalmente caracterizada pela presença do parasito nos tecidos cardíacos promovendo cardiomiopatias associadas a disfunção cardíaca e fibrose. A doença ainda pode acometer o trato gastrointestinal – promovendo transtornos motores gastrintestinais (CHAGAS, 1909; DE ALMEIDA et al., 2021).

## **1.3 Impactos dos componentes de protozoários no tratamento de câncer**

Após um trabalho realizado por pesquisadores da antiga União Soviética, foi demonstrado que pacientes infectados com o protozoário *T. cruzi* tinham raras incidências de câncer, com isso, abriram-se portas para abordagens de estudos com protozoários e tumores (ROSKIN, 1946). Em estudos com *Leshmania* spp., *Neospora caninum*, *Eimeria* spp., *Toxoplasma gondii*, *T. cruzi* e *Plasmodium* spp, pesquisadores relataram que a infecção por estes protozoários ou a exposição aos seus antígenos em diferentes células tumorais apresentaram efeitos antitumorais diversos, de acordo com cada espécie de protozoário e o tipo de célula tumoral analisada (BAIRD et al., 2013; CALLEJAS; MARTÍNEZ-SAUCEDO; TERRAZAS, 2018; CANER et al., 2020; LÓPEZ et al., 2010).

E em estudos antitumorais focados em proteínas recombinantes isoladas de *T. cruzi*, chaperona molecular calreticulina (TcCRT) e J18, têm sido demonstrado atividades antiangiogênicas e antiproliferativas, tornando estas proteínas prováveis mediadores para as respostas antitumorais (ATAYDE et al., 2008; RAMÍREZ et al., 2012)

Afim de contemplar a importância de estudos com as características nativas de um conglomerado de proteínas com potencial antitumoral de *T. cruzi*, estudos com extratos solúveis (ES) do *T. cruzi* são uma alternativa que tem demonstrado efeitos antitumorais promissores quando administrados em células cancerígenas (ABELLO-CÁCERES et al., 2016)

#### **1.4 P21 de *Trypanosoma cruzi*: aspectos gerais e sua relação com câncer de mama**

Silva e colaboradores (2009) identificaram uma nova proteína secretada por *T. cruzi* que foi denominada P21. Estudos com a forma recombinante dessa proteína (rP21) revelaram que ela é capaz de atuar na mobilização intracelular de cálcio, garantindo a invasão do *T. cruzi* na célula hospedeira (MARTINS et al., 2020).

Entretanto, o grupo também identificou um outro papel da P21, o de modular negativamente a progressão tumoral. Em estudos focados em células tumorais e não tumorais, Borges e pesquisadores (2020) constataram que a rP21 atua no microambiente tumoral de células epiteliais de mama triplo negativas (MDA-MB-231) ao dessensibilizar receptores CXCR4 em células tumorais. Uma vez que ativação destes receptores está relacionada a progressão tumoral. Além disso células tumorais quando tratadas com rP21 permanecem em maior número na fase G1 - fase que antecede a divisão celular - configurando um retardo na atividade de proliferação celular tumoral.

Para a continuidade dos estudos envolvendo a proteína P21 e suas interações com outras células, surge a necessidade da utilização de modelos experimentais desenvolvidos para evidenciar as ações desta molécula. Teixeira e colaboradores (2022) por técnica de CRISPR/Cas9, com objetivo de silenciar o gene P21, desenvolveram um constructo composto por sgRNA/Cas9/pTREX-n juntamente com cassetes doadores de gene resistentes a Blastomicina e transfectaram epimastigotas para interromper a região ORF do gene P21 dando lugar aos genes de resistência. Em quatro clones isolados após pela técnica de silenciamento de gene P21 de epimastigotas, foi verificado por eletroforese de amplificação do produto de RT-PCR que estes clones não amplificaram o gene P21 enquanto a população de epimastigotas selvagens amplificaram.

A luz dos expostos acerca da importância epidemiológica do câncer de mama e dos estudos para a sua terapêutica, esse trabalho teve por objetivo observar os efeitos dos extratos solúveis de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* selvagens e nocautes para o gene P21 nas respostas de quimiotaxia, proliferação celular e formação de colônias das células triplo negativas de câncer de mama.

## 2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama Triplo Negativo é uma patologia incidente na população feminina causadas por neoplasias invasivas e de difícil detecção, além de ser um carcinoma potencialmente metastático. Com isso, surge a necessidade de estudos com tratamentos que modulam negativamente o ambiente tumoral atuando nos mecanismos de proliferação e metástase das células tumorais. Extratos de *Trypanosoma cruzi*, surpreendentemente, ao serem administrados em tumores *in vivo* ou em células cancerígenas *in vitro*, apresentaram respostas antitumorais significativas. Além disso, em estudos utilizando proteínas recombinantes de *T. cruzi*, como rP21, chaperona molecular calreticulina (TcCRT) e J18, foi visto atividades antiangiogênicas, antiproliferativas e antimetastáticas.

A proteína rP21 de *Trypanosoma cruzi* identificada e caracterizada por Silva e colaboradores (2009) tem demonstrado um potencial papel antiangiogênico, antiproliferativo e antimetastático *in vitro*, tornando-se relevante o estudo da interação de extratos solúveis de epimastigotas em células tumorais de mama Triplo Negativas, verificando a atividade proliferativa e clonogênica das células e a potencialidade quimiotática dos extratos. Além disso, é importante desafiar as células do estudo com extratos silenciados para P21 a fim de elucidar as características fenotípicas das células tumorais frente aos tratamentos e contribuir para estudos futuros de terapêuticas antitumorais envolvendo compostos parasitários.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar o efeito de extratos solúveis de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* selvagens e nocautes para o gene P21 nas respostas de quimiotaxia e proliferação celular das células triplo negativas de câncer de mama.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar o perfil de separação de proteínas dos extratos solúveis através de eletroforese em gel SDS-PAGE.
- Analisar o potencial quimiotático dos extratos nas respostas de migração celular tumoral.
- Analisar, fenotipicamente, a formação de colônias das células tumorais após o tratamento com os extratos solúveis.
- Analisar, fenotipicamente, o índice mitótico das células de mama após tratamentos com extratos solúveis de *T. cruzi*.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 Cultura celular**

Foram utilizadas células tumorais de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich, MO, EUA) suplementadas com 10% de SFB, 2mM bicarbonato de sódio, 10 mM Hepes e antibióticos (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL) e incubadas à 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.2 Parasitos**

Foram utilizadas formas evolutivas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa G, selvagens (WT) e geneticamente modificados, sendo nocautes para o gene P21 (P21/KO) e controles da técnica de silenciamento (Cas9). Os parasitas foram gerados em colaboração com a pós-doutoranda Thaise Lara Teixeira e com o Professor Dr. José Franco da Silveira que manipularam os parasitos e fizeram a técnica de CRISPR/Cas9

no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os epimastigotas foram mantidos em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) constituído por nutrientes e antimicrobianos para um bom crescimento parasitário. O meio foi regulado para um pH 7,2-7,5, suplementado com soro fetal bovino (10%). Os parasitos foram armazenados em garrafas de cultivo de 300 cm<sup>2</sup> a 26-28°C, mantidos através de passagens semanais até a obtenção da fase logarítmica de multiplicação parasitária com predominância de epimastigotas. Para os organismos geneticamente modificados, foram administrados antibióticos que garantem a seleção de epimastigotas que passaram pela técnica CRISPR - pois estes apresentam genes de resistências aos antibióticos - 50 µg/mL de Blasticidina, 250 µg/mL de G418 e 300 µg/mL de Higromicina para os epimastigotas P21/KO e 250 µg/mL de G418 para o Cas9.

#### **4.3 Preparo dos extratos solúveis (ES)**

O preparo dos extratos solúveis foi realizado com a lise dos epimastigotas de *T. cruzi* WT, Cas9 e P21/KO. Os parasitos foram lavados 3x em e centrifugado a 4000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado, obtendo pellets secos de parasitos. Estes foram homogeneizados com o menor volume da solução de inibidor de protease (*cOmplete<sup>TM</sup>, Mini EDTA-free, Roche*) e submetidos a cinco ciclos de congelamento por nitrogênio e descongelamento em temperatura ambiente. Os lisados foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 min; coletou-se os sobrenadantes - ou também chamada de fração solúvel dos extratos - e armazenou em alíquotas a -20°C e identificou-os como ES- WT, ES- Cas9 e ES- P21/KO.

#### **4.4 Dosagem de proteínas totais dos extratos solúveis**

Para dosar as proteínas totais dos extratos solúveis, utilizou-se o método de *Bradford*, que consistiu em construir uma curva padrão da solução de BSA a 1 mg/mL submetida a uma diluição seriada, com água destilada, em placa de 96 poços, nas concentrações: 1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL, 7,81 µg/mL. Foi adicionado em triplicata, 2 µL de amostra proteica de extrato solúvel (diluídos em 18 µL água) e 200µL reagente de *Bradford*, a mistura foi incubada a 30 min. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (*VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices*,

*Sunnyvale*, CA, EUA) a partir do programa SoftMax® Pro (versão 6.3) na faixa de 595 nm. A construção da curva padrão a partir dos valores obtidos das absorbâncias foi realizada no programa Microsoft Excel.

#### **4.5 Purificação da proteína rP21**

A proteína P21 (GenBank: EU004210.1) foi produzida e purificada conforme descrito por (SILVA et al., 2009; SANTOS et al., 2014). Ademais, auxiliou na visualização da região de marcação eletroforética da proteína rP21, pois apresenta uma proximidade com a região de marcação da proteína nativa P21 (DA SILVA et al., 2009). Assim, utilizou-se bactérias *Escherichia coli* (linhagem BL21) previamente transfectadas com o plasmídeo pET-28a(+) – gene codificante completo para a proteína P21 nativa. Para o pré-inóculo, utilizou-se 150 µL destas bactérias em 50 µL de meio Luria Bertani estéril suplementado com 50 µg/mL de antibiótico de seleção Kanamicina, submeteu-se a mistura a agitação por 18 hrs a 37°C. Posteriormente, o pré-inóculo foi transferido para um frasco maior contendo 2.000 mL do mesmo preparo de meio Luria Bertani com Kanamicina, mantido sob agitação a 37°C até atingir a densidade óptica em torno de 0,5 a 0,9. Em seguida, para estimular a produção da proteína recombinante, adicionou-se Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (0,5 mM) por 3 hrs, seguido de centrifugação por 20 min a 4°C (10.000 rpm), o sobrenadante formado foi descartado e o pellet de bactérias foi homogeneizado em PBS 1x.

Adicionou-se lisozima (0,25 µg/mL) – para promover a lise bacteriana – e o material foi ressuspensionado por 15 min, seguido da sonificação da mistura durante 20 ciclos de 30 segundos com 1 min de intervalo entre os ciclos. O lisado bacteriano formado foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 min a 4°C, posteriormente, descartou o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em uma solução de ureia (9 M). A amostra foi incubada em uma coluna de níquel por 2 horas, sob agitação a 4° C. A proteína Rp21 apresenta uma cauda de histidina que tem afinidade ao níquel, ficando assim, aderida à coluna.

Em seguida, a coluna foi submetida às concentrações crescentes de imidazol, esse apresenta maior afinidade de se ligar a coluna quando comparada a interação com a histidina, ocasionando assim, a liberação da Rp21. Respectivamente, a coluna passou por três ciclos de centrifugação (2000 rpm) em tampão de ligação (Imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.0 20 mM, ureia 6M), seguido do descarte do

sobrenadante. Três centrifugações a 2000 rpm em tampão de lavagem (Imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.0 20 mM, ureia 6M. Quatro ciclos de centrifugação (2000 rpm) em tampão de eluição (Imidazol 1 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.0 20 mM, ureia 6M), seguido do recolhimento do sobrenadante – mistura que contém a rP21.

Para a purificação da proteína livre de resíduos de ureia, além do renovelamento proteico, o sobrenadante da eluição foi dialisado em PBS (1x) a partir de uma membrana de diálise de 3,5 kDa (Spectra/131198) por 48 horas, sob agitação contínua a 4°C. Após o primeiro dia de diálise, a solução PBS (1x) foi repostada. Em seguida, a proteína foi incubada por 15 minutos com resina de polimixina B, que teve por intuito retirar as endotoxinas de LPS.

#### **4.6 Eletroforese dos extratos solúveis**

Para a visualização do perfil proteico dos extratos solúveis de epimastigotas [100 µg/L] e confirmação à técnica de purificação da rP21 – com a colaboração do grupo do laboratório de Imunofisiologia da Reprodução (UFU) - foi realizado a separação proteica pela técnica de eletroforese com gel Bis-Tris SDS PAGE a 13% (m/v), em condições redutoras na presença do SDS e β-mercaptoetanol. O gel de separação consistiu em: 2,12 mL de H<sub>2</sub>O; 2,0 mL Tris (1,5M) pH 8,8; 3,72 mL de solução bis:acrilamida na porcentagem (%) 1:29; 80 µL SDS 10%; 80 µL APS 10%; 8 µL TEMED. O gel de empilhamento (4%) foi preparado com 1,2 mL de H<sub>2</sub>O; 0,5 mL Tris (0,5M) pH 6,8; 267 µL de bis:acrilamida na porcentagem (%) 0,8:30; 20 µL SDS 10%; 20 µL APS 10%; 2 µL TEMED.

As amostras proteicas foram misturadas em tampão 10x (Tris-HCl pH 6,8 (100mM), SDS 4%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol e H<sub>2</sub>O Mili-Q). O padrão de eletroforese utilizado foi o *PageRuler™ Thermo Fisher Scientific Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa #26616*, ambos os tampões foram aplicados no aparato vertical de eletroforese. A separação proteica ocorreu no sentido 100V - 210V por 80 min; o gel foi corado com *Coomassie blue G 0,5%*, preparado em 50 % metanol/10% ácido acético por 30 min. Por fim, aplicou-se o descorante (metanol, ácido acético glacial e água destilada).

#### **4.7 Análise de viabilidade celular**

Para identificar se a ação do extrato solúvel WT mantinha as células metabolicamente ativas ou não, realizou-se um ensaio colorimétrico de viabilidade

celular utilizando Resazurina, solução inicialmente azul, mas quando adentra em células metabolicamente ativas é reduzida ao seu produto resofurina, tornando a solução rosa (MARKOSSIAN et al., 2021). O ensaio ocorreu em placas de 96 poços contendo  $1 \times 10^4$  células por poço, suplementadas com meio DMEM a 10% SFB. O grupo tratado recebeu concentrações [ $\mu\text{g/mL}$ ] crescentes do ES-WT (10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500), o controle negativo recebeu DMSO 10 % e o controle positivo, apenas meio de cultivo. As células foram incubadas por 72 hrs com 5% de  $\text{CO}_2$  em  $37^\circ\text{C}$ . Ao final adicionou-se 4,0  $\mu\text{L}$  de Resazurina por 20 min e a leitura ocorreu em espectrofotômetro GloMax® Promega, na faixa de 600 nm.

#### **4.8 Perfil quimiotático dos extratos solúveis**

No ensaio de migração para análise do potencial quimiotático dos extratos, foram adicionados  $1 \times 10^5$  de células - livres de SFB - no compartimento superior de suportes permeáveis de *Transwells* (poros de 8  $\mu\text{m}$ ). Para as câmaras inferiores, foi utilizado 500  $\mu\text{L}$  de solução do extrato WT [ $50 \mu\text{g/mL}$ , ou meio de cultura com SFB 10% (controle positivo) ou apenas meio de cultura (controle negativo). As células foram incubadas por 72 hrs com 5% de  $\text{CO}_2$  em  $37^\circ\text{C}$ . Ao final, as células que não migraram foram retiradas com *swabs* estéreis, já as células migradas – aderidas no compartimento inferior- foram fixadas em álcool 70% e coradas com cristal de violeta (0,5 %). A visualização das células foi realizada em um microscópio invertido *Nikon*, série Eclipse, modelo Ti-S, equipado com luz polarizada. Capturou-se 10 imagens por *Transwell* em aumento de 10 x, para assim, contabilizar células utilizando o *software* ImageJ Fiji.

#### **4.9 Ensaio clonogênico**

Utilizando placas de 6 poços com volume de 2000  $\mu\text{L}$ , foram plaqueadas  $2 \times 10^2$  células, suplementadas com meio DMEM 10% SFB. No dia seguinte, aplicou-se, separadamente, os tratamentos com extratos solúveis [ $50 \mu\text{g/mL}$ ] WT, CRISPR/cas9, P21/ko e P21/ko adicionado de proteína recombinante P21 [ $50 \mu\text{g/mL}$ ]; para o grupo controle, apenas foi repostado o meio de suplementação. As células foram incubadas à  $37^\circ\text{C}$  em uma atmosfera umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , por 15 dias. Em consequente, retirou-se o meio e fixou as células com 1000  $\mu\text{L}$  de solução metanol + acetona (1:1) por 30 min, seguido da coloração dos poços com cristal de violeta (0,5 %)

*overnight*. No dia seguinte, o corante foi retirado e os poços lavados com PBS. Foi realizado 3 eventos em triplicata do experimento.

Foram consideradas como colônias de células, contingências celulares de mais de 50 células, bem delimitadas como “círculos”. O índice clonogênico por grupo estudado foi dado por:

$$\text{índice clonogênico (\%)}: \frac{\text{n}^\circ \text{ total de colônias do poço}}{\text{n}^\circ \text{ de células plaqueadas por poço}} \times 100$$

#### 4.9 Ensaio mitótico

Aplicou-se em lamínulas (colocadas em placas de 24 poços)  $1 \times 10^4$  células suplementadas com DMEN 10% SFB. No dia seguinte, as células receberam tratamentos, separadamente, com os extratos solúveis [50 µg/mL] WT, CRISPR/cas9, P21/ko e P21/ko adicionado de proteína recombinante P21 [50µg/mL], as células em controle não receberam qualquer tratamento. O tratamento foi retirado - após 24 horas - e as células continuaram suplementadas por 72 hrs. Em todos os processos, as placas foram mantidas em estufas a 5% de CO<sub>2</sub> em 37°C.

O meio de cultivo foi retirado e os poços lavados com PBS, seguidos de fixação por formaldeído 4% por 40 min, com posterior lavagem em PBS. As lamínulas foram mantidas em solução com PGN e marcadas por uma hora com DAPI 1:500 diluído em PGN saponina. As lamínulas foram lavadas em PBS e água destilada e montadas em lâminas para leitura em microscópio confocal de fluorescência em aumento 20X.

O experimento foi realizado em quadruplicada. Contabilizou-se as células em mitose dentre 500 células analisadas por lamínula (*software* ImageJ Fiji). O índice mitótico foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$\text{índice mitótico (\%)}: \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células em mitose por lamínula}}{\text{n}^\circ \text{ de células totais analisadas (500)}} \times 100$$

#### 4.10 Análise estatística

Os dados obtidos dos experimentos foram, primeiramente, verificados quanto a normalidade de suas distribuições, avaliando se os dados eram dispostos de forma paramétrica ou não (D'Agostino & Pearson test). A partir destes resultados, aplicou-se testes estatísticos: one-way ANOVA, two-way ANOVA ou one Sample Wilcoxon,

(GraphPad Prism Software, versão 9.0). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão, as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Gel de eletroforese e dosagem de proteínas

A eletroforese por separação SDS-PAGE dos extratos de epimastigotas WT, Cas9 e P21/KO apresentou perfis de banda, aparentemente, parecidos, com marcações de bandas entre 10-25, 25-35, 35-40, 40-55 (kDa). A corrida com a proteína recombinante auxiliou na visão da marcação conhecida da banda de 19 kDa. O retângulo em vermelho (letra B) é a área aproximada para a marcação da proteína nativa P21 (21 kDa), aparentemente, há bandas entre os três extratos nesta posição, entretanto a fraca marcação na área impossibilita a nitidez do resultado.

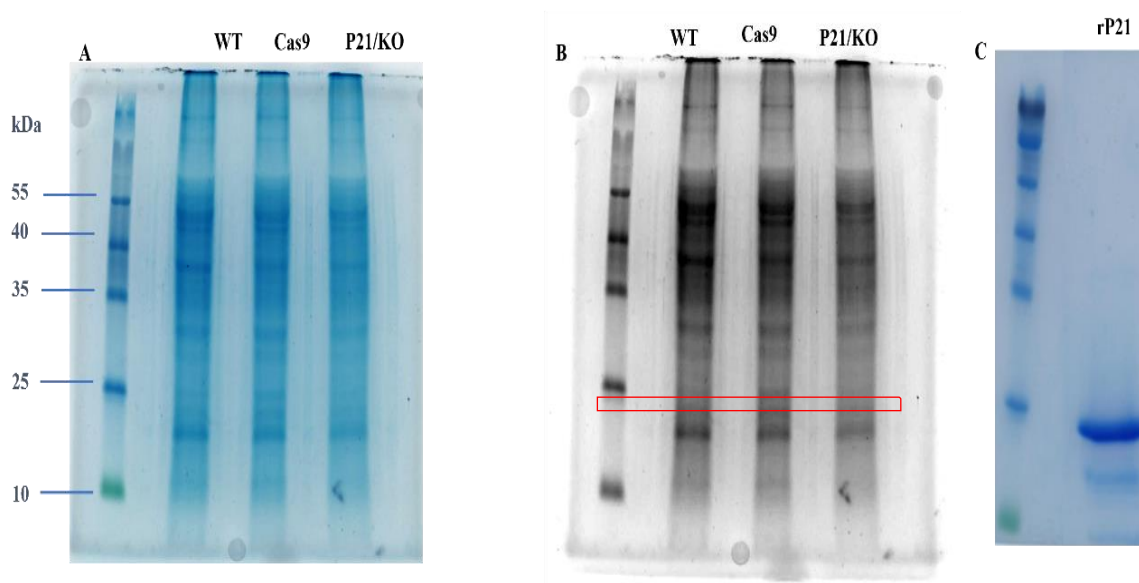


**Figura 2:** Eletroforese de separação por SDS-PAGE de extratos proteicos de epimastigotas. A – Extratos solúveis (100  $\mu$ g), imagem em RGB; B- Extratos solúveis (100  $\mu$ g), imagem em 8 bits. O retângulo vermelho representa a área provável para a marcação da P21 nativa; C- rP21(19 kDa).

Após as leituras de absorbâncias do ensaio Bradford em reação às soluções de BSA e dos ES, construiu-se uma curva padrão com  $R^2$  igual a 0,97, relacionando concentração e absorbância. E obteve-se os seguintes valores [ $\mu$ g/mL]: WT = 8970,

Cas9 = 8810, P21/KO = 6520. Os valores obtidos foram suficientes para a preparação dos experimentos seguintes.

## 5.2 Ensaio de viabilidade celular

As células tumorais MDA MB-231, submetidas aos tratamentos por ES, obtiveram resultados de viabilidade celular acima de 87,19 %, demonstrando que os tratamentos com ES não apresentaram toxicidade para as células do estudo. Para o prosseguimento dos experimentos, foi padronizada a concentração de 50 µg/mL.

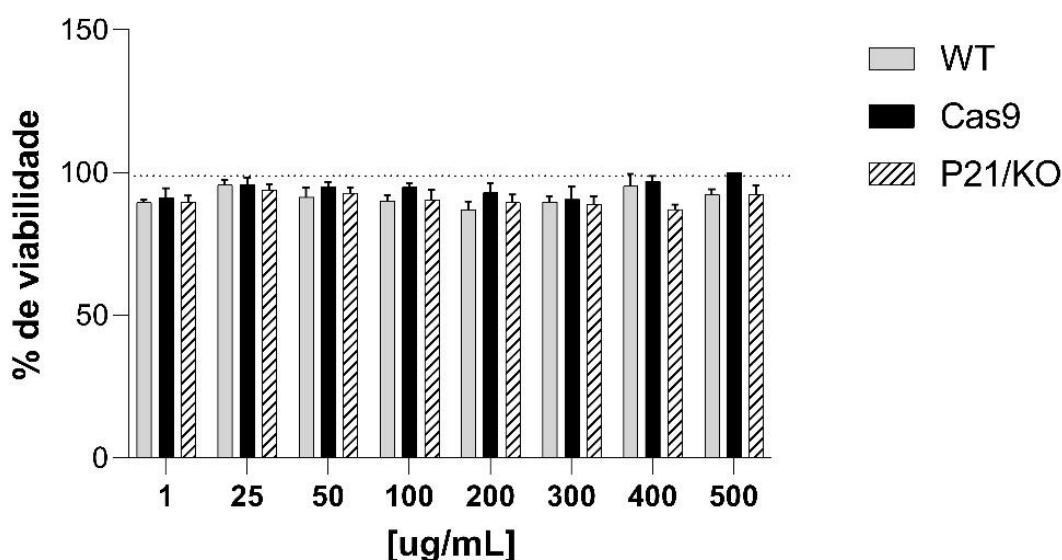


**Figura 3:** Médias com erro padrão dos ensaios de viabilidade por teste de Resazurina em células tumorais de mama tratadas com extratos solúveis. Utilizou-se teste de *One Sample Wilcoxon* teste com média teórica de 100% de células viáveis.

## 5.3 Perfil quimiotático dos extratos solúveis

São demonstrados na figura 4 as médias das contagens de células que migraram quando estimuladas por ES-WT [50 µg/mL]. A migração celular do grupo ES-WT foi significativamente menor que a migração do controle negativo. Observando assim, que ES-WT não tem capacidade quimiotática, quando comparado tanto com o controle positivo quanto com o controle negativo.

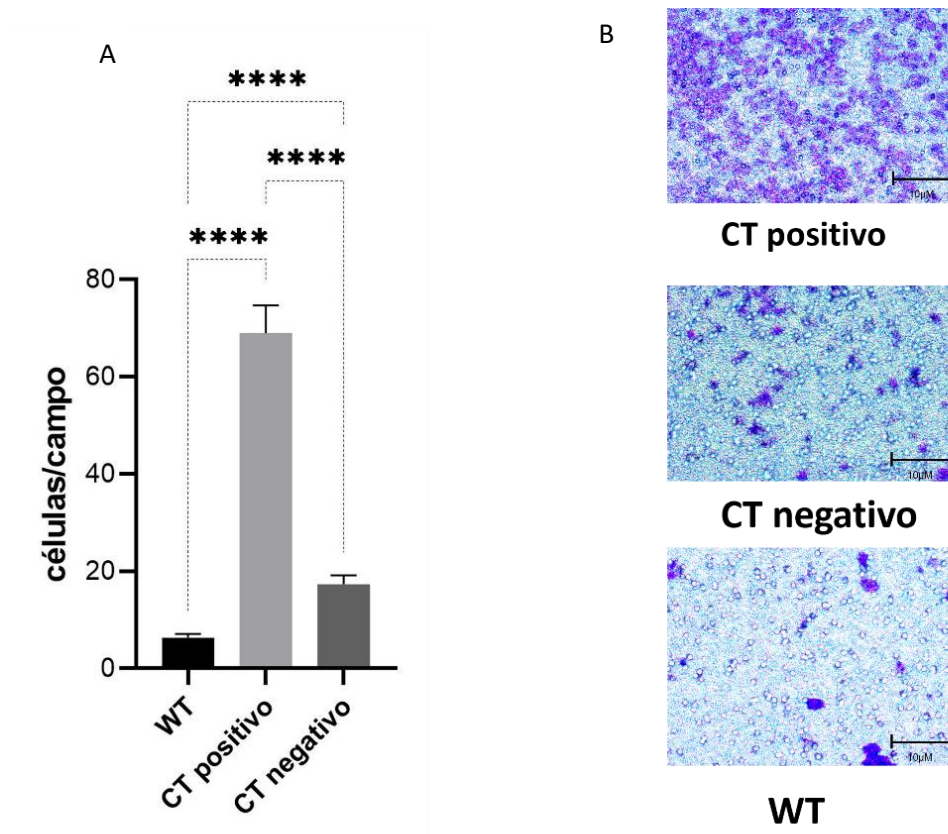


**Figura 4:** Médias com erro padrão de células/campo em ensaio de migração celular (MDA MB-231). ES de epimastigotas WT [50µg/mL], diminuem a atividade migratória intrínseca da célula tumoral (CT negativo- célula e DMEM) (CT positivo) (A) Amostras de imagens de migração entre os grupos, aumento de 10X (B). Análises estatísticas: *OneWay ANOVA* \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 5.4 Ensaio clonogênico

No ensaio clonogênico, observou-se (figura 5) que todos os tratamentos com os extratos solúveis apresentaram índices de formações de colônias de células tumorais menores que o grupo controle. Após a adição da proteína recombinante P21, o ES-P21/KO + rP21 (sem formação de colônias) obteve resultado diferente do ES-P21/KO (presença de colônias) - configurando uma tendência de formação de colônia na ausência da proteína P21.

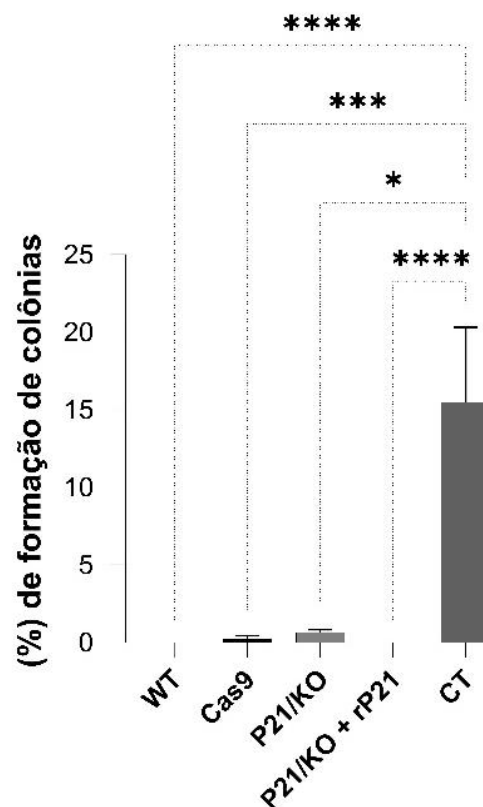


**Figura 5:** Médias com erro padrão de índices das formações de colônias após os tratamentos: 50  $\mu\text{g/mL}$  dos ES de epimastigotas WT, Cas9, P21/KO e P21/KO + rP21 [50  $\mu\text{g/mL}$ ]. Os poços CT possuíam apenas células tumorais de mama e meio de suplementação. Análises estatísticas: *OneWay ANOVA* – testes de múltiplas comparações *Dunn's* em relação ao grupo controle, \* $p=0,0218$ ; \*\*\* $p=0,0003$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ .

### 5.5 Ensaio mitótico

Os índices mitóticos das células tumorais de mama (figura 6) não apresentaram diferença estatística entre os grupos de tratamento. Contudo, há uma tendência de diminuição no índice mitótico dos grupos tratados com ES de epimastigotas em comparação com o grupo controle.

É visto ainda que os índices mitóticos dos extratos WT (1,55%) e P21/KO + rP21 (1,44%) foram aproximados, entretanto, o resultado apresentado pelo extrato P21/KO (2,01%) foi maior que eles. Demonstrando assim, tendência parecida ao ensaio clonogênico.

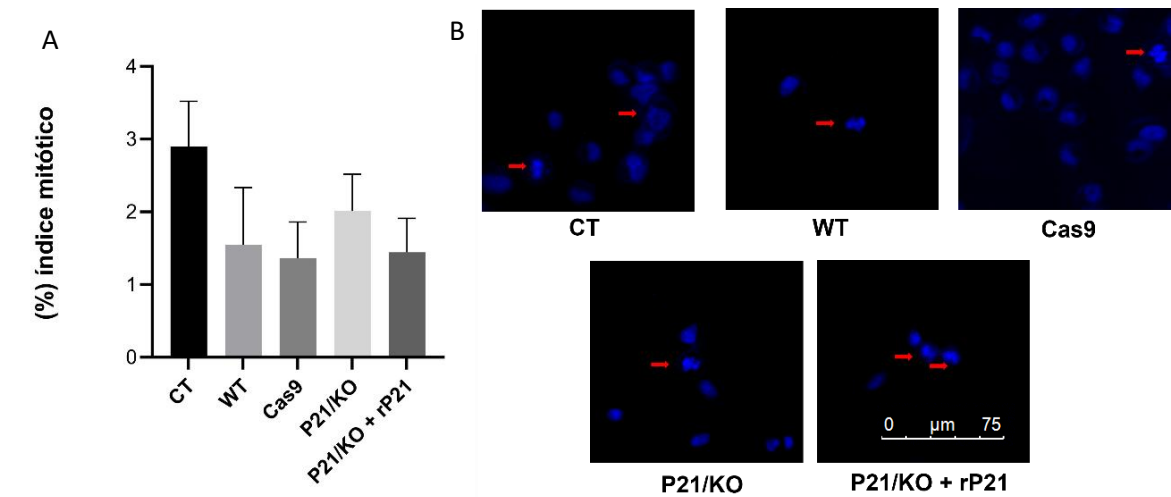


**Figura 6:** Médias com erro padrão de índices mitótico após 24 horas de tratamento (A) Utilizo-se 50  $\mu\text{g/mL}$  dos extratos solúveis WT, Cas9, P21/KO e P21/KO + rP21 [50  $\mu\text{g/mL}$ ]. O CT possuía apenas células tumorais de mama e meio de suplementação. Os ES de epimastigotas demonstram uma tendência de diminuir o potencial mitótico das células TN. Análises estatísticas: *OneWay ANOVA* – testes de múltiplas comparações *Dunn's* sem significância entre os grupos. (B) As setas em vermelho ilustram as células em estágio mitótico de cada grupo analisado. As capturas ocorreram em aumento de 20X

## 6. DISCUSSÃO

Em 1930 o soviético Roskin ao aplicar extrato de cultura de *T. cruzi* nos tumores inoperáveis de pacientes com câncer de laringe e esôfago, observou significativa atividade antitumoral (KREMENTSOV, 2009). Extratos solúveis são uma alternativa para estudos desse interim, uma vez que são um *pool* de moléculas provenientes da lise de *T. cruzi* (MARCHINI et al., 2011). Nossos experimentos de dosagem proteica com método de Bradford permitiram concentrações significativas de proteínas em extratos solúveis de epimastigotas de cepa G de *T. cruzi* WT, Cas9 e P21/KO; e nossa eletroforese de separação de proteínas evidenciaram perfis de misturas com pesos moleculares distintos, parecidos entre os extratos.

Um esforço científico é avaliar se na forma evolutiva epimastigota de *T. cruzi* os perfis das proteínas do parasito se mantem parecidos com as formas infectivas (tripomastigotas) e replicativas (amastigotas) (SCHAUB, 2021). Em um trabalho envolvendo epimastigotas (cepa CL) de *T. cruzi* com mutante alélico ou para superexpressar ou causar a deleção do gene de TcCRT, foi visto que epimastigotas com deleção do gene tiveram sua capacidade proliferativa diminuída e sua metaciclogênese

inibida; além disso - a partir de extrato de epimastigota - averiguou por eletroforese, western blot e estimativa de densidade proteica que os extratos de epimastigotas com deleção apresentaram uma redução na produção de polipeptídios TcCRT  $\cong$  6 vezes menor do que parasitos WT e os extratos com epimastigotas de superexpressão do gene teve a produção cerca de 2 vezes maior que os parasitas selvagens (SÁNCHEZ VALDÉZ et al., 2013).

Em nosso estudo, a falta de nitidez da marcação das bandas em ES-WT parece estar relacionada a uma falta de estímulo experimental para a produção de P21, como por exemplo privar SFB no cultivo de epimastigotas. Nesse contexto, estudos de nosso grupo verificaram que ao privar nutrientes como soro fetal bovino das culturas de epimastigotas, foi observado uma maior expressão gênica da P21 (MARTINS et al., 2020). Além disso, é importante mais estudos para a detecção da proteína P21 utilizando anticorpos específicos para maior consistência do resultado de perfil proteico dos ES de epimastigotas silenciados para o gene P21.

Quanto às células cancerígenas, os estudos com células MDA MB-231 - potencialmente metastáticas – comumente apresentam SFB 10% como quimioatraente para investigações de potenciais quimiotáticos para causar migração celular (ZHANG et al., 2016). Nos resultados do presente trabalho são observados que os extratos solúveis de epimastigotas WT, diminuíram a atividade migratória intrínseca da célula tumoral e não apresentaram perfil quimiotraente para a MDA MB-231, pois, respectivamente, migraram menos que os controle negativo e positivo. Reforçando a ideia de que os extratos solúveis de epimastigotas WT não são quimioatraentes e não propiciam a atividade metastática das células tumorais.

Com estes achados e somado ao resultado dos extratos solúveis de epimastigotas manterem as células MDA MB-231 viáveis, definiu-se que os extratos solúveis de *T. cruzi* poderiam ser utilizados em conjunto as células tumorais de mama para que fosse avaliado, fenotipicamente, os efeitos da ausência da P21 nativa nas respostas clonogênicas e mitóticas de células tumorais de mama TN.

Em análises em células TN de câncer de mama, observou-se que algumas proteínas isoladas do *T. cruzi* interferem no ciclo celular, a rP21 prolongou a fase G1 - período que antecede a duplicação do DNA- e retardou a proliferação celular tumoral (BORGES et al., 2020). Em estudo utilizando ES de epimastigotas com o objetivo de

desafiar a proteína nativa TcCRT, utilizou anticorpos anti rTcCRT - em camundongos com linhagem de adenocarcinoma mamário - e observou-se que animais inoculados com ES + anticorpos apresentaram um aumento do volume tumoral quando comparados com tratamento apenas com ES (regressão tumoral), indicando a proteína nativa TcCRT como um mediador de efeito proliferativo (ABELLO-CÁCERES et al., 2016). Ainda que as análises individuais das proteínas TcCRT, gp82 e P21 de *T.cruzi*, utilizadas no tratamento às células cancerígenas demonstrem envolvimento com a regressão da proliferação celular, também é observado que o envolvimento em conjunto das diversas proteínas provenientes de extratos de *T.cruzi* apresentam resultados semelhantes de diminuição da atividade proliferativa de células cancerígenas, evidenciando que o agente *T.cruzi* apresenta um *pool* proteico em consonância com a resposta antitumoral (DING et al., 2022).

No ensaio clonogênico, os resultados demonstraram que o tratamento com os ES-WT evitou colônias e a ausência do gene P21 nos extratos-P21/KO e Cas9 parece estar relacionado com formações clonogênicas *in vitro*. A formação de colônias está relacionada a um processo mitogênico intenso e, notavelmente, os resultados de índices mitóticos do trabalho mantiveram um padrão parecido ao ensaio clonogênico, uma vez que há uma tendência de diminuir a atividade mitótica com uso de ES-WT ou P21/KO + rP21 e aumentá-la na ausência da P21 de ES- P21/KO e Cas9, assim configurando a hipótese de que a proteína nativa P21 parece estar envolvida também em mediar ciclos celulares de células cancerígenas diminuindo a proliferação celular e tendenciando para uma regressão na capacidade de formar colônias.

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, demonstramos que extratos solúveis de epimastigotas (cepa G) apresentaram um perfil proteico diverso e, quando administrados em modelo celular MDA-MB-231, mantiveram a viabilidade celular e reduziram as atividades metastáticas, clonogênicas e mitóticas das células tumorais de mama Triplo Negativas, evidenciando que compostos de *T.cruzi* são capazes de mediar respostas em células tumorais. Além disso, o uso ES de epimastigotas silenciadas para o gene P21, conformou a hipótese da potencialidade da P21 de evitar a progressão tumoral. Ademais, este trabalho sustenta estudos futuros, a nível biomolecular, para elucidar o mecanismo de ação dos extratos solúveis de epimastigotas em células tumorais.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABELLO-CÁCERES, P. et al. Does native *Trypanosoma cruzi* calreticulin mediate growth inhibition of a mammary tumor during infection? **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, 13 set. 2016.
- ATAYDE, V. D. et al. **A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells**. 2008.
- AYOUB, N. M. et al. Combined crizotinib and endocrine drugs inhibit proliferation, migration, and colony formation of breast cancer cells via downregulation of MET and estrogen receptor. **Medical Oncology**, v. 38, n. 1, 1 jan. 2021.
- BAIRD, J. R. et al. Immune-Mediated Regression of Established B16F10 Melanoma by Intratumoral Injection of Attenuated *Toxoplasma gondii* Protects against Rechallenge. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 469–478, 1 jan. 2013.
- 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, 19 out. 2020.
- BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M. C. F. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Fatores prognósticos em câncer de mama**, v. 1, n. 22, p. 69–82, 2011.
- CALLEJAS, B. E.; MARTÍNEZ-SAUCEDO, D.; TERRAZAS, L. I. Parasites as negative regulators of cancer. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 5, 31 out. 2018.
- CANER, A. et al. Targeting of antitumor immune responses with live-attenuated *Leishmania* strains in breast cancer model. **Breast Cancer**, v. 27, n. 6, p. 1082–1095, 29 nov. 2020.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.
- DE ALMEIDA, A. M. V. et al. Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos, fisiopatológicos e de transmissão / Chagas disease: Epidemiological, physiopathological and transmission aspects. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 18931–18944, 3 set. 2021.
- DING, H. et al. **Anti-Tumor Effect of Parasitic Protozoans**. **Bioengineering**, 1 ago. 2022.
- FITZGIBBONS, P. L. et al. **Prognostic Factors in Breast Cancer-Fitzgibbons et al** **Arch Pathol Lab Med**. 2020.
- IARC. **Age standardized (World) incidence rates, breast, all ages**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 11 out. 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Taxas de mortalidade das 5 localizações primárias mais frequentes em 2020, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100.000 mulheres, Brasil, entre 2016 e 2020**. 2020.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. 6. ed. Rio de Janeiro, 2020.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. DAS C.; ROQUE, A. L. R. Landmarks of the Knowledge and *Trypanosoma cruzi* Biology in the Wild Environment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 6 fev. 2020.

- KREMENTSOV, N. *Trypanosoma cruzi*, cancer and the Cold War. 2009.
- LÓPEZ, N. C. et al. Antiangiogenic and Antitumor Effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. e730, 6 jul. 2010.
- MARCHINI, F. K. et al. Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 22 set. 2011.
- MARKOSSIAN, S. et al. **Assay Guidance Manual**. 2021. Disponível em: <<https://ncats.nih.gov/expertise/preclinical/agm>>.
- MARTINS, F. A. et al. The Recombinant Form of *Trypanosoma cruzi* P21 Controls Infection by Modulating Host Immune Response. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 5 jun. 2020.
- MARTINS, L. C. et al. Padrão de metástase no câncer de mama triplo negativo. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 27, n. 1, p. 8–14, mar. 2017.
- MEDINA, M. A. et al. **Triple-negative breast cancer: A review of conventional and advanced therapeutic strategies**. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 1 mar. 2020.
- RAMÍREZ, G. et al. Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth. **Molecular immunology**, v. 52, n. 3–4, p. 133–40, out. 2012.
- ROSKIN, G.; EXEMPLIARSKAIA, E. Protozoeninfektion und experimenteller Krebs.I. Mitteilung. Zeitschrift fur Krebsforschung, Berlin, bd. 34, p.628-645. 1931.
- ROSSONI, E. S. S. et al. PERFIL MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA / MOLECULAR PROFILE OF NEGATIVE TRIPLE BREAST CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 82283–82303, out. 2020.
- SÁNCHEZ VALDÉZ, F. J. et al. *Trypanosoma cruzi* carrying a monoallelic deletion of the calreticulin (TcCRT) gene are susceptible to complement mediated killing and defective in their metacyclogenesis. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 3, p. 198–205, mar. 2013.
- SANTOS, M. A. DOS et al. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 4, 4 mar. 2014.
- SCHAUB, G. A. An Update on the Knowledge of Parasite–Vector Interactions of Chagas Disease. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 12, p. 63–76, maio 2021.
- SILVA, C. V. D. 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.
- TEIXEIRA, T. L. et al. Ablation of the P21 Gene of *Trypanosoma cruzi* Provides Evidence of P21 as a Mediator in the Control of Epimastigote and Intracellular Amastigote Replication. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 18 fev. 2022.
- TESTON, E. F. et al. Feelings and difficulties experienced by cancer patients along the diagnostic and therapeutic itineraries. **Escola Anna Nery**, v. 22, n. 4, 27 ago. 2018.
- YANG, A. et al. Melatonin inhibits triple-negative breast cancer progression through the Lnc049808-FUNDC1 pathway. **Cell Death and Disease**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2021.

ZHANG, C. et al. A microfluidic Transwell to study chemotaxis. **Experimental Cell Research**, v. 342, n. 2, p. 159–165, 15 mar. 2016.