

Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências de Botucatu

ATIVIDADE *in vivo* DE PARASPORINA EXTRAÍDA DE *B. thuringiensis* SOBRE O CÂNCER COLORRETAL MURINO
(CT-26)



Monografia entregue ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Bacharel no Curso de Ciências Biomédicas.

Aluna: Cecilia Pessoa Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

Botucatu – SP
2012

ATIVIDADE *in vivo* DE PARASPORINA EXTRAÍDA DE *B. thuringiensis* SOBRE O CÂNCER COLORRETAL MURINO
(CT-26)

Monografia entregue ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Bacharel no Curso de Ciências Biomédicas.

Aluna: Cecilia Pessoa Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

Botucatu – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Rodrigues, Cecilia Pessoa.

Atividade *in vivo* de parasporina extraída de *B. thuringiensis* sobre o câncer colorretal murino (CT-26)/ Cecilia Pessoa Rodrigues. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -

Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ramon Kaneno

Capes: 21102007

1. Citotoxicidade de mediação celular. 2. Intestinos – Câncer. 3. Toxicidade – Testes. 4. Células T. 5. *Bacillus thuringiensis*.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Efeito antitumoral; Modelo murino; Parasporina.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, que me ajudou vencer mais essa etapa da minha vida, garantido saúde e encontros com pessoas que edificaram minha essência. Meus pais pelo amor incondicional e por sempre promover as possibilidades para eu seguir atrás dos meus sonhos, mesmo os mais impossíveis como ir pra lua ou ganhar o prêmio Nobel.

Os funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, por serem sempre solícitos e bem humorados, garantindo um ótimo ambiente de trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro e acreditar no potencial do meu projeto (2011/20162-0). À Profa. Dra. Marise Suzuki, que forneceu a parasporina, Prof. Dra. Ana Angélica Fernandes, que ajudou nas análises bioquímicas, o Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan e Profa. Dra. Maria Aparecida Rodrigues, que auxiliaram com a interpretação histológica do projeto.

Meus amigos e companheiros de curso, que sempre estiveram comigo nos momentos difíceis. Inclusive na biblioteca aos sábados estudando virologia.

À República BNB, pela amizade, pelos cafés da tarde com bolo e biscoito de queijo, pelas piadas, conversas e ajudas.

Por fim, quero agradecer as meninas do laboratório (“Kanenas”) e nossas afilhadas por todos os ensinamentos passados, todos os experimentos, todas as sextas de fazer meio, almoços, cafés e, principalmente, obrigada por me ensinar que amizade e trabalho podem andar juntos. Meu orientador Ramon Kaneno, pela paciência, por sempre responder todas as minhas perguntas, pelas oportunidades criadas, aulas ministradas e por ter me ensinado que professor não é um cargo exercido apenas na sala de aula e não se limita apenas aos ensinamentos acadêmicos.

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele”.

Buda

Resumo do Projeto

Bacillus thuringiensis (Bt), é uma bactéria ubíqua, Gram-positiva esporulada que produz em sua fase estacionária do ciclo de crescimento uma proteína cristalizável (Cry), aplicada como praguicida devido sua ação tóxica sobre insetos, nematelmintos, ácaros e protozoários. Estudos recentes indicam que algumas cepas da bactéria produzem proteínas denominada parasporinas, não possuem ação praguicida, mas exibem ação citotóxica significativa frente a linhagens de células de câncer humano e de animais. No entanto, são poucos os dados disponíveis na literatura a respeito dessa ação contra linhagens de câncer colorretal e não existem estudos sobre seus efeitos *in vivo*. Dada à alta incidência de câncer na população humana consideramos relevante a avaliação do possível papel antitumoral *in vivo* da parasporina. Dessa maneira, o presente trabalho visa avaliar a toxicidade *in vitro* da parasporina de *B. thuringiensis*, em células da linhagem de câncer colorretal murino (CT-26) e o efeito sobre desenvolvimento *in vivo*. Assim, camundongos Balb/c foram s.c inoculados com células da linhagem CT-26 e tratados semanalmente i.p com a parasporina ativada por digestão enzimática com tripsina ou proteínase K. Nossos resultados mostram, pela primeira vez, que, apesar da atividade antitumoral *in vitro*, a parasporina não combate o crescimento tumoral *in vivo*. Ao contrário, a proteína se mostrou altamente tóxica, afetando fígado e baço, com possível reflexo em outros órgãos, diminuindo a sobrevida dos animais tratados. Os resultados indicam a necessidade de estudos para detoxificação ou melhor manipulação da parasporina para uso terapêutico e abrem a perspectiva de análise dos efeitos toxicológicos da exposição repetitiva de agricultores a essa toxina.

Palavras-Chave: Citotoxicidade; Efeito antitumoral; Modelo murino; Parasporina

Project Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt), is an environmental Gram-positive spore-forming bacterium that produces crystalline parasporal protein (Cry) during sporulation. The inclusions often exhibit strong and specific insecticidal activity, making Bt an agent for agricultural controlling insects pest, mites, protozoa and nematodes. Recent studies reported that some of these Crys do not show cytotoxicity against insects but they are capable to kill some human and animal cancer cells. These proteins were denominated parasporins (PS). However, antitumor activity of Bt parasporin on the development of murine colorectal cancer (CT-26), are not well studies and these are no reports on the *in vivo* effect of these proteins. Thus, the present study evaluated the *in vitro* and *in vivo* anti-tumoral activity of Bt parasporin against the murine colorectal cancer line CT-26. Therefore, Balb/c mice were s.c. inoculated with CT-26 cells and weekly treated with parasporin (i.p.) pre-activated by enzymatic digestion with trypsin or proteinase K. Our results have shown, for the first time, that despite the anti-tumor activity *in vitro*, parasporin crystals couldn't combat tumor growth *in vivo*. Instead, this protein was highly toxic, affecting the liver and spleen, with possible effect on other organs, decreasing the survival of treated animals. The results indicate the need for studies to better detoxification or manipulation of parasporin for therapeutic use and new studies for analysis of toxicological effects of repetitive exposure of farmers to this toxin.

Keywords: Cytotoxicity, antitumoral effect; murine model; Parasporina

SUMÁRIO

RESUMO DO PROJETO.....	7
PROJECT ABSTRACT.....	8
1.INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1. OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DA PARASPORINA.	14
2.2. CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS.	14
2.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	14
2.4. ANIMAIS	15
2.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL IN VIVO.	15
2.6. SACRIFÍCIO E COLETA DO MATERIAL.	17
2.7. ENSAIO DE LINFOTOXICIDADE	17
2.8. DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS.....	17
2.9. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.	17
2.10. HISTOLOGIA.....	18
3.RESULTADOS	19
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE BT.	19
3.2. EFEITO CITOTÓXICO IN VITRO DE PS-Pk OU PS-Tp.	20
3.3 – EFEITO ANTITUMORAL IN VIVO.	21
3.4. EFEITO IN VIVO DO TRATAMENTO ANTITUMORAL COM PS-Pk E PS-Tp SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL.	22
3.5. SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS	24
3.6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE IN VIVO.	25
3.7. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS ÀS FUNÇÕES HEPÁTICAS E RENAIS.	26
3.8. GERAÇÃO DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS.	28
3.9. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS.	30
3.10. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	32
4.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO	33
5. REFERÊNCIAS	39
6. ANEXOS	42

1.INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria aeróbia Gram-positiva esporulada ubíqua, pertencente ao grupo de *Bacillus cereus*[1-3]. Está presente em diversos sistemas ambientais como serapilheira, solo, insetos, animais, ambiente aquático e recentemente alguns estudos demonstraram a presença deste microrganismo em plantas [4]. Este microrganismo foi isolado pela primeira vez no Japão de larvas do “bicho da seda”, *Bombyxmori*, e foi considerada uma bactéria entomopatogênica [1], pois durante a fase estacionária do ciclo de crescimento bacteriano se forma uma proteína cristalizável (Cry)[5]. Essa proteína é tóxica para larvas de insetos, nematelmintos, ácaros, e protozoários, porém não é patogênico para mamíferos, pássaros, anfíbios e répteis representando uma alternativa promissora e valiosa para uso na agricultura e controle florestal, uma vez que é menos agressivo ao meio ambiente do que os pesticidas químicos convencionais [6-8]. A ação inseticida dos cristais proteicos ocorre devido a sua proteólise no lúmen intestinal da larva, que resulta na liberação de fragmentos tóxicos que causam edema e ruptura das células do intestino médio do organismo [9, 10].

Os genes responsáveis pela formação das Crys de *B. thuringiensis* ainda não estão completamente identificados, porém acredita-se que estão presentes no plasmídeo bacteriano, contidos, normalmente, no segmento de componentes estruturais dos elementos de transporte. A diversidade de cepas de *B. thuringiensis* e o elevado grau de plasticidade genética das Crys resultam em uma ampla variedade de proteínas parasporais. Tais proteínas possuem cerca de 600 aminoácidos, apresentando três domínios estruturais em comum (α -bundle, β -prims e β -sandwich) [3]. Logo, as diferentes cepas podem exibir ação inseticida específica contra insetos distintos, por exemplo, lepidóptera (Cry-1), lepidóptera e díptera (Cry-2), coleóptera

(Cry-3) e díptera (Cry-4). Desse modo, a cepa produtora de proteínas poderia ser usada como um potente controlador de epidemias causadas por dípteros, como, por exemplo, os mosquitos vetores da malária, dengue, febre amarela e filariose [4].

Durante estudos com os cristais paraporais se observou que existem no meio ambiente, cepas de *B. thurigiensis* que formam cristais não inseticidas. [11]. Em um estudo pioneiro foi descoberto que uma linhagem de câncer humano sofria ação citotóxica frente aos Crys produzidos por *B. thurigiensis*, que não possuíam ação inseticida. Tal estudo redundou em uma nova categoria de proteína parasporal denominada parasporina que, por definição, é capaz de matar preferencialmente células cancerígenas [12].

Mizuki et al. [6] obtiveram a primeira parasporina por expressão do gene Cry que codifica a proteína Cry31Aa (conhecida também por parasporina-1), que mostrou ser bastante eficiente contra células T humanas leucêmicas (MOLT-4), mas não se mostrou com ação inseticida ou ação hemolítica. Em seguida foram isolados e identificados mais três tipos de paraporinas, parasporina-2 (Cry46Aa), parasporina-3 (Cry41Aa) e paraporina-4 (Cry45Aa) todas com ação seletiva contra células cancerígenas.

Em 2004, Akio et. al. [3] isolaram o gene da toxina e analisaram a ação citotóxica da proteína recombinante contra células humanas normais e tecidos neoplásicos e verificaram que a parasporina não tinha ação inseticida e nem hemolítica, mas era altamente citotóxica contra várias linhagens de câncer humano principalmente HepG2 e Jukat (hepatocarcinoma), com baixa toxicidade frente a hepatócitos normais (HC) e células HeLa (colo uterino). No mesmo estudo observou-se que em peças de tecidos de câncer hepático e de colo de útero a toxina matou

preferencialmente as células cancerígenas. Os autores observaram que a ação citotóxica não está associada à apoptose celular.

O *B. thurigiensis* sorotipo *shandougiensis* produz a parasporina-4 que, quando solubilizada em meio alcalino e ativada por proteinase K tem ação citotóxica para células leucêmicas humanas e ação fraca ou ausente em linhagens de câncer do colo uterino (HeLa)[13]. Estudando parasporinas provenientes de 40 cepas não entomopatogênicas, Yasunori et. al. [4] observaram que a cepa M019 sintetiza uma nova parasporina, CP84 e duas novas variações da parasporina-1, CP78A e CP78B, com ação tóxica preferencial sobre células de câncer hepático e de colo uterino.

Os mecanismos das ações antitumoral dos cristais de parasporina não estão completamente entendidos, mas observou-se que o glicinaldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma proteína ligante de 68-kDa presente na superfície de células leucêmicas humanas sensíveis à toxina [8]. Embora Akio et. al. [3] não tenham observado indução de apoptose nas células tumorais, Katayama [9] observou que a parasporina-1Aa1 não forma poros citotóxicos, mas é capaz de aumentar a concentração de Ca^{+2} intracelular após 1-3 minutos de exposição induzindo apoptose das células [14-17]. A parasporina-2Aa1 também não é formadora de poros em membranas mitocondriais e retículo endoplasmático, mas não se conhece o receptor específico expresso pelas células suscetíveis, responsável pela morte celular [18-20].

Diferentemente, a parasporina-3Aa1, é um exemplo de proteína tipicamente composta por três domínios, conformacionalmente semelhante aos Crys de ação inseticida, o que leva a hipótese de que esta toxina atua como formadora de poros nas membranas plasmáticas das células alvo. [13].

A parasporina-4Aa1 é diferente de todas as outras parasporinas em vários aspectos químicos e físicos [21] e é possível que seu modo de ação antitumoral seja

completamente diferente das outras, Okumura[22] sugere que esta parasporina é uma toxina formadora de poros β com ação independente de colesterol.

Em 2009 Suzuki et. al. desenvolveram uma pesquisa sobre o grupo de Cry por cepas de *B.thuringiensis* encontradas no Brasil e observou que algumas delas produziram proteínas não larvicidas (dados não publicados).

Considerando os dados disponíveis na literatura, observa-se que embora a ação antitumoral das parasporinas tenha sido demonstrada *in vitro*, contra diferentes linhagens de células tumorais, são escassas as informações sobre: a) suscetibilidade de células de câncer colorretal à ação das proteínas; b) o efeito antitumoral da administração da proteína a animais portadores do tumor; c) efeito tóxico ao hospedeiro d) o efeito sobre o sistema imunológico e e) os principais alvos moleculares das parasporinas.

Assim, para tentar responder a algumas dessas questões o presente projeto foi formulado com o objetivo de avaliar se parasporinas solubilizadas e posteriormente proteolisadas por tripsina e proteinase K inibe o crescimento *in vitro* e *in vivo* de câncer colorretal murino (CT-26) e se o tratamento favorece a geração de linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos contra células tumorais CT-26.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção e isolamento da parasporina.

A parasporina utilizada para os ensaios foi obtida pelo *B. thuringiensis* TC 2.3.1R6 oriunda do cultivo transgênico de cana de açúcar e estocada no Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP (Piracicaba) a partir da cultura da cepa TC2.3.1R6 de Bt em meio de levedura com caseína hidrolisada (CCY) sob agitação a 200 rpm a 28°C até completa esporulação e formação dos cristais proteicos. Posteriormente, a proteína foi solubilizada com tampão carbonato 50 mM pH 10,5 e DTT (Dithiothreitol) 10 mM. A quantificação da proteínas foi realizada pelo método de BRADFORD (1976) , para posterior ativação dessas proteínas com as enzimas proteolítica proteinase K (PS-Pk) ou Tripsina (PS-Tp). Para ativação com PS-Pk ou PS-Tp a proteína solubilizada foi tratada com a enzima na proporção de 30 µg de enzima para 1 mg/mL de proteína durante 1 hora sob baixa agitação a temperatura de 30°C. Após centrifugação o sobrenadante foi submetido a nova quantificação.

2.2. Cultura de células tumorais.

Células de câncer colorretal murino (CT-26) cedidas pelo Laboratório de Imunologia de Tumores Departamento de Patologia da Universidade de Pittsburgh, PA. Foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25 mM de HEPES, 100 mM de piruvato de sódio, 1% aminoácidos não essenciais, 2mM de L-glutamina e 40 µg/ml de gentamicina, sob tensão de 5% de CO₂ a 37°C.

2.3. Ensaio de citotoxicidade.

A atividade citolítica da parasporina foi determinada em ensaio de microcitotoxicidade previamente descrito com modificações [23]. Foram distribuídas

100 uL de células CT-26 (2×10^5 /ml) em placas de fundo chato de 96 poços e incubadas por 24 horas para a aderência das células. A toxina tratada com PS-Pk ou PS-Tp (1mg/ml) em diferentes concentrações foi adicionada à cultura, seguindo-se incubação por 24 horas adicionais. Posteriormente, foi lavada, adicionada com solução de MTT a 1 mg/ml (Sigma) e mantidas por 3 horas em estufa a 37°C. Em seguida, foi removido o sobrenadante e os cristais de formazana, solubilizados com 100 µl de DMSO. Por fim, foi determinada a densidade óptica por um espectrofotômetro (Biotek-Wallac) a 540 nm.

2.4. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c machos com 45 a 60 dias de idade provenientes do Biotério do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP inoculados via s.c.com 2×10^5 células CT-26 e tratados a cada sete dias com diferentes doses de PS-Pk ou PS-Tp. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em ambiente controlado, entre 22 - 24 °C e ciclo claro/escuro de 12/12h.

Os grupos experimentais foram compostos por quatro animais (n=4) sendo realizados experimentos independentes. Todos os procedimentos envolvendo os animais de experimentação seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu (protocolo nº347).

2.5. Avaliação do efeito antitumoral *in vivo*.

A avaliação *in vivo* foi realizada por mensuração do tumor com auxílio de um paquímetro eletrônico e *screening* hipocrático que forneceu uma estimativa geral dos

efeitos farmacológicos e toxicológicos do tratamento sobre o estado consciente e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividade sobre o sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo (Tabela 1). O volume do tumor foi calculado de acordo com a fórmula elipsoide modificada por Tomayko e Reynolds (1989): $V = \frac{1}{2} (l \times w^2)$, em que V= volume; l= distância entre os bordos opostos mais distantes e w= distância entre os bordos opostos mais próximos.

Parâmetros		Semana antes do Sacrifício			Dia do Sacrifício		
		PBS	PS-Pk	PS-Tp	PBS	PS-Pk	PS-Tp
Atividade geral	4						
Frêmito Vocal	0						
Resposta ao toque	4						
Aperto de cauda	4						
Contorções	0						
Trem posterior	0						
Reflexo de Endireitamento	4						
Tônus Corporal	4						
Força para agarrar	4						
Ataxia	0						
Reflexo Auricular	4						
Tremores	0						
Convulsões	0						
Sinal de Straub	0						
Hipnose	0						
Anestesia	0						
Lacrimação	0						
Ptose Palpebral	0						
Piloereção	0						
Respiração	4						
Cianose	0						
Número de mortos							

Tabela 1 – Parâmetros avaliados para *screening* hipocrático. Avaliação realizada semanalmente

2.6. Sacrifício e Coleta do Material.

Trinta dias depois do inóculo tumoral os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram o baço, fígado e tumor removidos. Partes dos órgãos foram fixadas em solução de formol a 10% por 24h, passados em banho de água por mais 24h e depois mantidos em álcool 70% até a inclusão em blocos de parafina, para posterior análise histológica. A outra parte do baço dos animais foi utilizada para o ensaio de linfotoxicidade. O soro para dos animais para testes bioquímicos foi retirado após o sacrifício por perfusão cardíaca com auxílio de seringas de 1 mL.

2.7. Ensaio de Linfotoxicidade

Os baços foram retirados, macerados e colocados em placa de Petri para aderência dos macrófagos por 2 horas, o sobrenadante recolhido e os linfócitos co-cultivados em placas de 96 poços de fundo plano com células tumorais CT-26 por 4 horas em diferentes concentrações (50:1, 25:1, 12,5:1 e 6,25:1). Após lavagem, as células tumorais viáveis remanescentes foram quantificadas pelo ensaio de incorporação de MTT.

2.8. Determinação das citocinas.

Para verificar a capacidade dos linfócitos T produzirem citocinas em cultura, 24 horas após o início da co-cultura de linfócitos T e CT-26, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -20°C para posterior análise. As citocinas IFN- γ e IL-10 foram dosadas através do kit ELISA MAX DELUXE Bioscience conforme instruções do fabricante.

2.9. Avaliação Bioquímica.

As enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas por teste cinético (*in vitro*) da empresa

BioClin. No caso da ALT, ocorre a catalisação e transferência do grupamento amina alanina para α - cetoglutarato, levando a formação de piruvato e glutamato. O piruvato em presença do LDH reage com o NADH, reduzindo-se a lactato e o NADH oxida-se a NAD⁺. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da ALT na amostra.

Quanto à AST, ocorre a catalisação e transferência de grupos amina do aspartato para α - cetoglutarato, levando a formação de oxalacetato e glutamato. O Oxalacetato em presença do MDH reage com o NADH, reduzindo-se a malato e o NADH oxida-se a NAD⁺. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da AST na amostra.

Em ambos os teste foram feitas 4 leituras em comprimento de onda igual a 340 nm e intervalo de 1 minutos entre elas. A média das diferenças de absorbância por minuto foi multiplicada por 1.746, conforme instrução do fabricante (©BioClin).

O teste de uréia enzimática (©Bioclin) foi baseado na técnica enzimática colorimétrica de ponto final, em que salicilato, hipoclorito de sódio, amônia em pH alcalino origina um composto esverdeado, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de uréia na amostra analisada. A absorbância da amostra e do padrão foi lida em filtro de 600 nm, acertando o zero com o branco. Os cálculos para a dosagem de uréia (mg/dL) foi feita através do cálculo: $\text{Uréia(mg/dL)} = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão}} \times 70$.

2.10. Histologia.

Baço e fígado dos animais foram coletados e fixados em solução tamponada de formol 10% e rotineiramente processados para preparação de lâminas e coloração pela técnica de HE para avaliações histopatológicas.

3.RESULTADOS

3.1. Caracterização da proteína de Bt.

A bactéria usada nestes ensaios foi *B. thuringiensis* TC 2.3.1R6 (Bt TC2.3.1R6) oriunda do cultivo transgênico de cana de açúcar e estocada no Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP (Piracicaba). As proteínas produzidas pelo Bt TC2.3.1R6 quando grande ($>0,5$ mm) pode ser observada em microscópio óptico (1000x), porém quando vista ao microscópio eletrônico de varredura foram observadas 4 formas diferentes de cristais (Fig. 1).

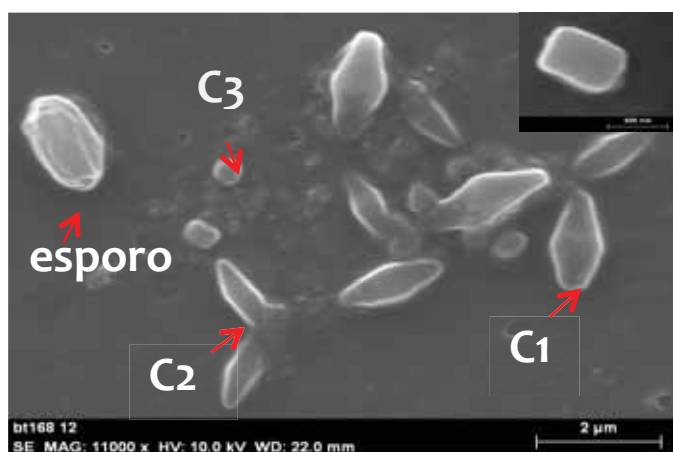


Figura 1- Microscopia Eletrônica de Varredura (11000x) mostrou 4 diferentes formas de cristais: C1- bipiramidal grande (tamanho similar a um esporo); C2- Bipiramidal médio; C3- pontual redondo ($< 0,5\mu\text{m}$); detalhe: pontual retangular ou cúbico ($< 0,5\mu\text{m}$) foto do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP (Piracicaba).

Para avaliação do perfil molecular das proteínas foi realizado uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) observando-se a presença de 4 bandas, com destaque para as proteínas de 75, 60, 30 e 5 kDa.

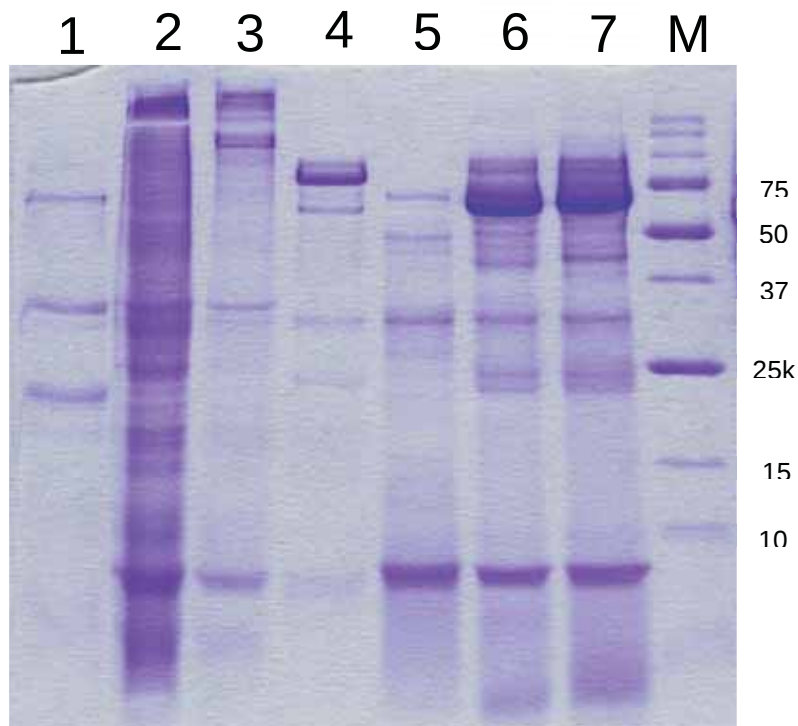


Figura 2- Perfil de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. 1- cristais e esporos de *B. thuringiensis* var. *israelensis*; 2- Cristais e esporos de Bt TC2.3.1R6; 3- Cristais de Bt TC2.3.1R6 purificados por gradiente de sacarose; 4- cristais de Bt TC2.3.1R6 s. ; 5- cristais solubilizados de BtTC2.3.1R6 digerido por proteinase k; 6- cristais solubilizados de BtTC2.3.1R6 digerido por Trispina; 7- Cristais solubilizados de BtTC2.3.1R6 digerido por quimotripsina. M- Marcador de peso molecular. Corrida eletroforética realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP (Piracicaba).

3.2. Efeito citotóxico in vitro de PS-Pk ou PS-Tp.

Com o intuito de avaliar quais doses seriam efetivas contra células de origem tumoral (CT-26), estas foram plaqueadas em placas de 96 wells e após aderência de 24 horas foi adicionado PS-Pk e PS-Tp em diferentes concentrações.

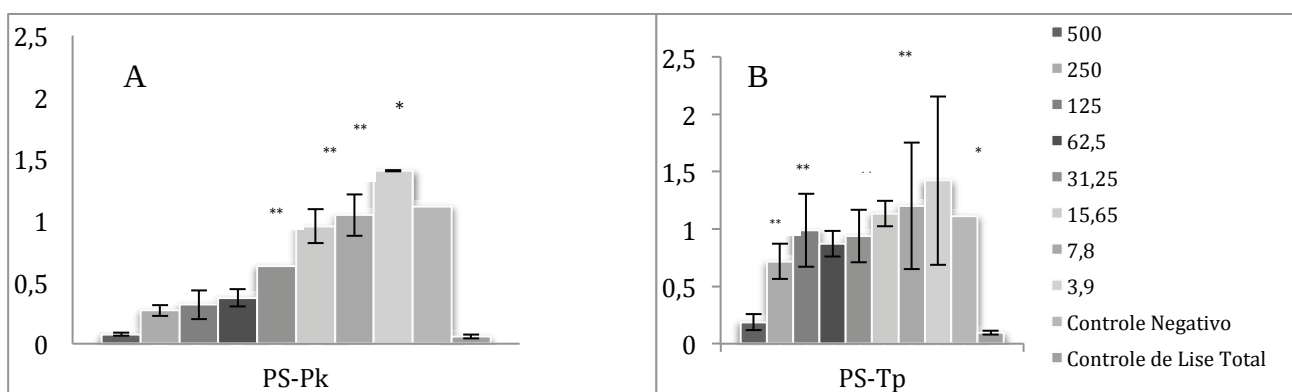


Figura 3 - **A)**Atividade Citotóxica de PS-Pk **B)** Atividade Citotóxica de PS-Tp em diferentes concentrações (µg) sobre células CT-26. ANOVA $p = <0,001$. Análise feita a partir de 3 ensaios independentes.

Com base nos resultados obtidos e nos dados da literatura hipotetizamos que a proteína poderia ter ação antitumoral *in vivo*, o que seria essencial para que o produto continuasse a ser avaliado quanto ao seu potencial de uso na terapia antitumoral.

3.3 – Efeito antitumoral *in vivo*.

Nosso passo seguinte foi avaliar se as proteínas hidrolisadas teriam ação antitumoral *in vivo*, informação essencial para que o produto continuasse a ser avaliado quanto ao seu potencial de uso na terapia antitumoral. Sendo assim, foi estabelecido que os animais seriam tratados com 50 – 500 µg da toxina, pois estas concentrações mostraram maior ação antitumoral de ambos os preparados (Fig.3).

Com o intuito de avaliar a melhor via de inoculação da parasporina, os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p) ou subcutânea peritumoral (s.c.) com 30 µg da toxina PS-Pk ou PBS (Fig-4).

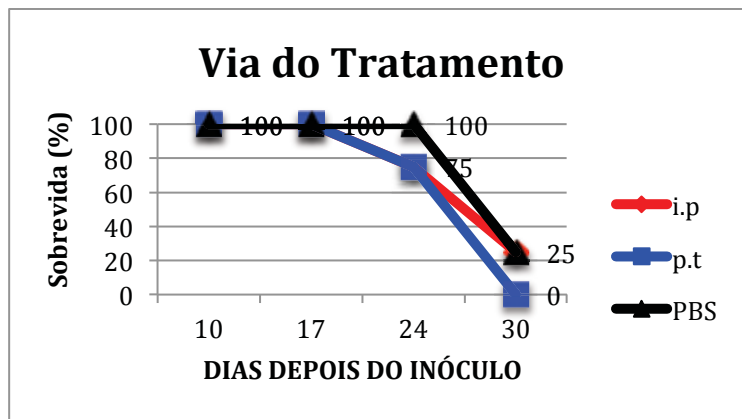


Figura 4- Comparação do tratamento dos animais pelas vias i.p. e s.c.. Animais tratados com 30 ug de PS-Pk. Controles inoculados com PBS por via i.p; n=4.

3.4. Efeito in vivo do tratamento antitumoral com PS-Pk e PS-Tp sobre o crescimento tumoral.

O tratamento dos animais com 50 ug de Ps-Pk não alterou o padrão de crescimento tumoral, enquanto a administração de doses mais elevadas resultou em prejuízo do hospedeiro, com aumento significativo do volume tumoral final Fig 5A.

O tratamento com PS-Tp também não resultou em qualquer efeito antitumoral(Fig.5B). Além disso, notamos que o grupo que recebeu a dose mais baixa não resistiu até o término do experimento.

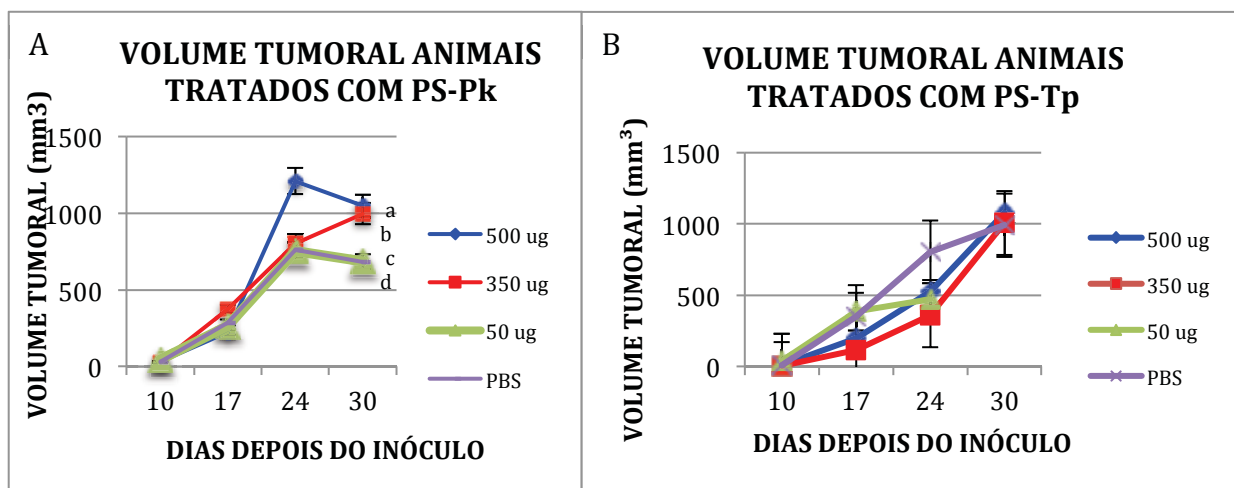


Figura 5 – **A)** Média de seis experimentos independentes quanto ao volume tumoral de animais tratados com PS-Pk. Sendo que $p < 0,001$ (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey $a \neq c$, $a \neq d$, $b \neq c$, $b \neq d$. **B)**

Volume tumoral dos animais tratados com PS-Tp ANOVA $p > 0,05$; $n=4$.

Em vista desses resultados e da observação de hepatoesplenomegalia, optamos por reduzir as doses de parasporina para 20, 5 e 1 ug, com o objetivo de reduzir a toxicidade do tratamento. Como pode ser observado nas Figuras 6A e B, essa mudança não se mostrou eficiente, visto que doses tão baixas quanto 1 ug foram tóxicas, provocando caquexia, hepatomegalia e morte de grande número de animais.

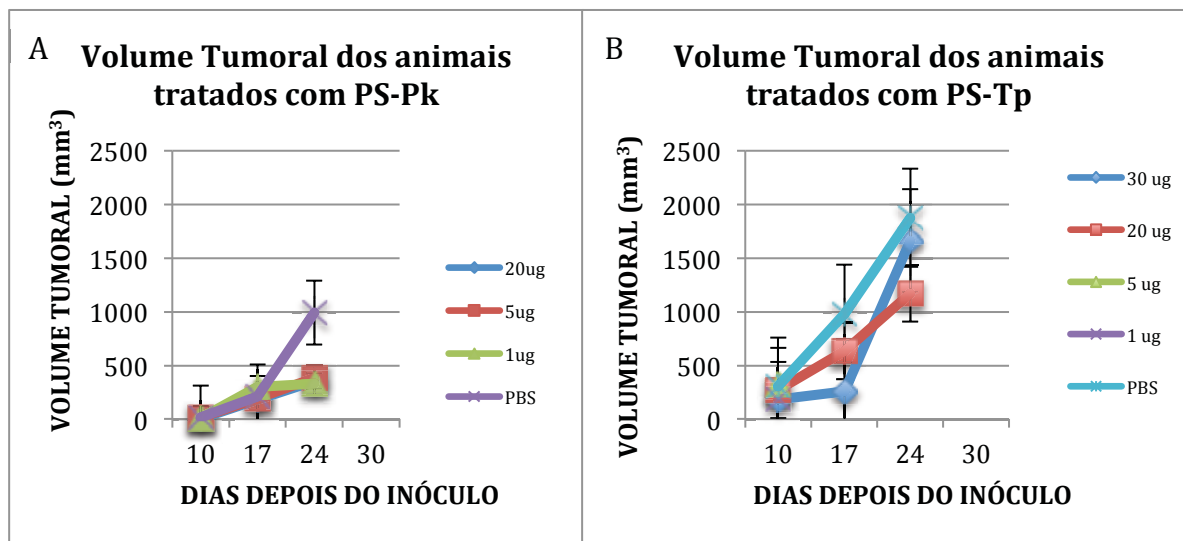


Figura 6. **A)** Volume dos tumores dos animais tratados com doses baixas da toxina proteolizada por PS-Pk, Kruskal-Wallis $p=0,419$. **B)** Volume dos tumores dos animais tratados com doses baixas PS-Tp. Kruskal-Wallis $p>0,05$; $n=4$.

3.5. Sobrevida dos animais

A Figura 7 mostra a sobrevida dos animais portadores de tumor tratados com diferentes doses de PS-Pk e PS-Tp. Como pode ser observado, os animais que receberam as toxinas tiveram sobrevida tão baixa ou pior do que os controle tratados apenas com PBS.

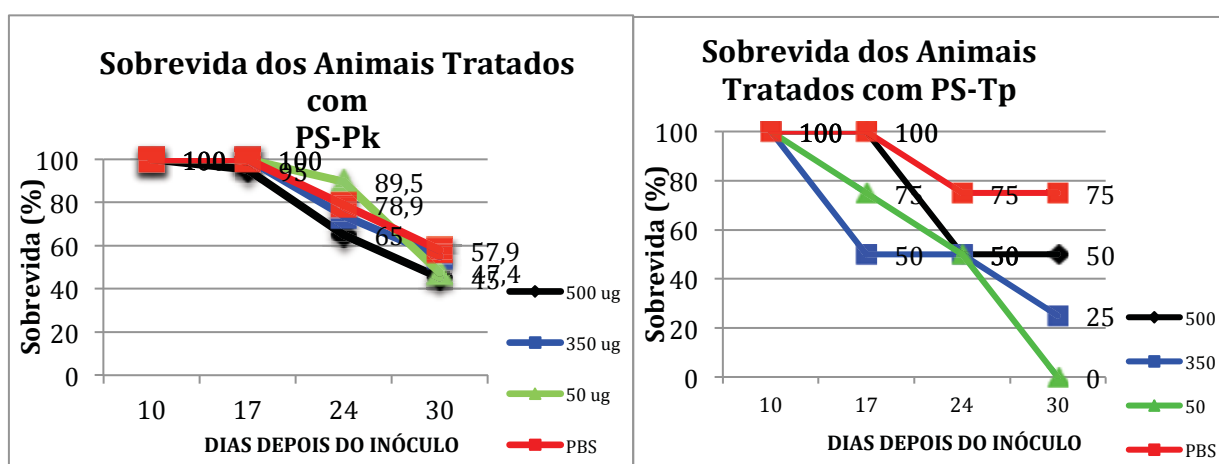


Figura 7– Sobrevida dos animais portadores de tumor CT26, submetidos ao tratamento com diferentes doses de parasporina . **A)** Tratamento com PS-Pk; $n=4$. **B)** Tratamento com Ps-Tp; $n=4$.

3.6. Avaliação da Toxicidade *in vivo*.

Observamos esplenomegalia e uma alta taxa de mortalidades, impossibilitando a continuidade do experimento 2 e 3 do tratamento de PS-Pk e o de doses baixas de PS-Tp, até o período previsto. As figuras abaixo ilustram os achados macroscópicos dos animais estudados.

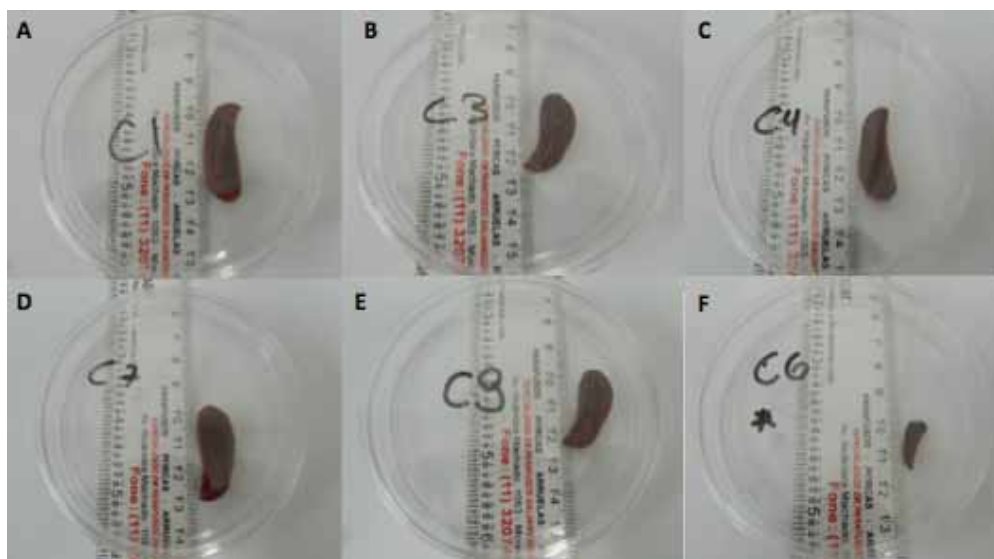


Figura 8 – **A)** Esplenomegalia observada em animal tratado com 500 mg de PS-Tp. **B)** Esplenomegalia observada em animal tratado com 350 mg PS-Tp. **C)** Esplenomegalia observada em animal tratado com 500 mg de PS-Pk. **D)** Esplenomegalia observada em animal tratado com 350 mg de PS-Pk. **E)** Baço de animal controle tumoral. **F)** Baço de animal controle de normalidade.

Após eutanásia dos animais os órgãos foram observados macroscopicamente e todos os grupos apresentaram esplenomegalia (Fig. 8 e Tabelas 2 e 3). Os baços foram então pesados e os resultados descritos nas Tabelas 2 e 3, indicando que altas doses da toxina estão diretamente relaciona à esplenomegalia.

Grupo de Tratamento (Dose PS-Pk)	Peso médio dos baços (g)
500 ug	1,072
350 ug	0,730
50 ug	0,798
30 ug	0,478
PBS	0,647

Tabela 2 -Massa média dos baços dos animais tratados com PS-Pk. ANOVA $p>0,05$

Grupo de Tratamento (Dose PS-Pk)	Peso médio dos baços (g)
500 ug	2,695
350 ug	2,13
50 ug	n.d.
30 ug	n.d.
PBS	1,62

Tabela 3 – Massa média dos baços dos animais tratados com PS-Tp. ANOVA $p>0,05$.

3.7. Parâmetros bioquímicos relacionados às funções hepáticas e renais.

Para avaliar a extensão dos danos causados pela toxina, fizemos a determinação de parâmetros bioquímicos de funções hepáticas e renais [25].

Tendo como base valores encontrados na literatura observamos que nossos controles normais apresentaram valores aceitáveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST) e uréia enzimática.

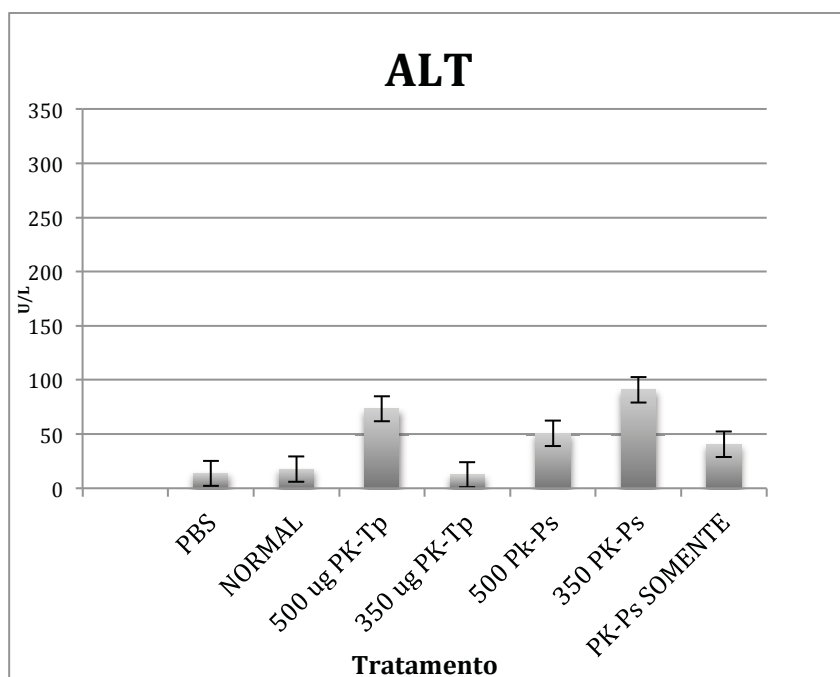


Figura 9- Dosagem de ALT (U/L) presente no soro dos animais tratados. Análise realizada por teste cinético; n=4.

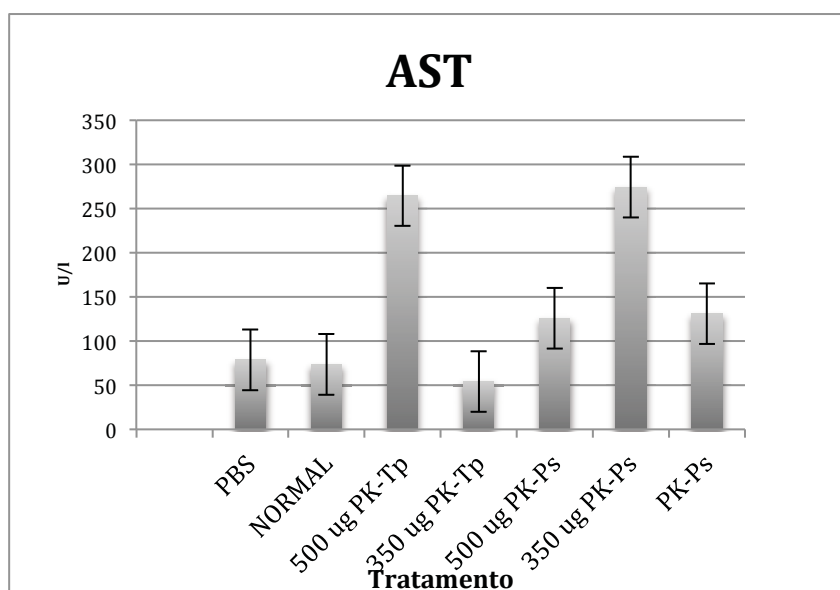


Figura 10- Dosagem de AST (U/L) presente no soro dos animais tratados. Análise realizada por teste cinético; n=4.

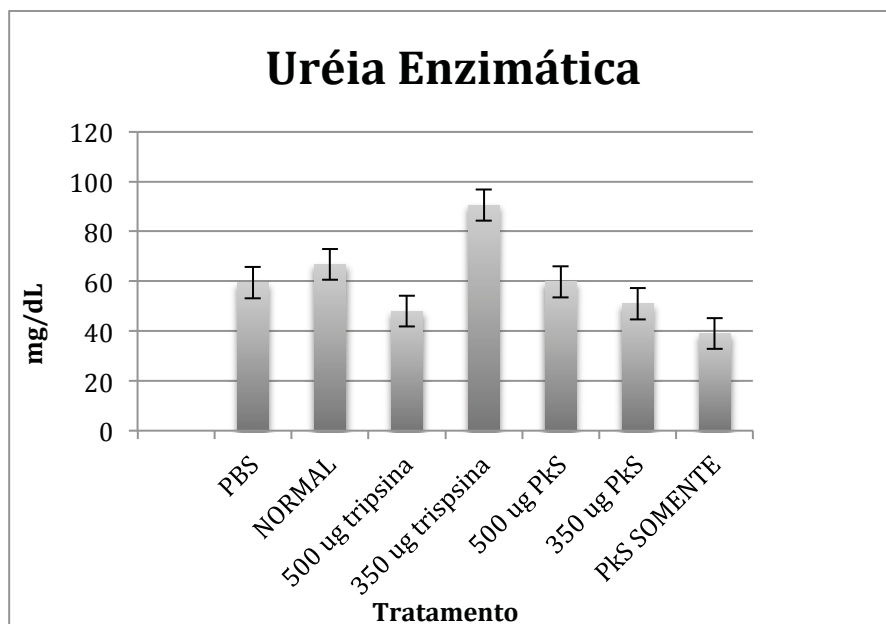


Figura 11- Dosagem em mg/dL de uréia enzimática no soro dos animais tratados. Análise realizada pela técnica enzimática colorimétrica de ponto final; n=4.

3.8. Geração de células *T* citotóxicas.

Realizamos o ensaio de MTT com o intuito de avaliar a citotoxicidade do linfócitos gerados a partir dos animais inoculados frente à célula tumoral CT-26. Os resultados apresentados são referentes aos ensaios, em que os animais foram inoculados com 2×10^5 células/mL de CT-26 e tratados com diferentes doses de PS-Pk ou PS-Tp.

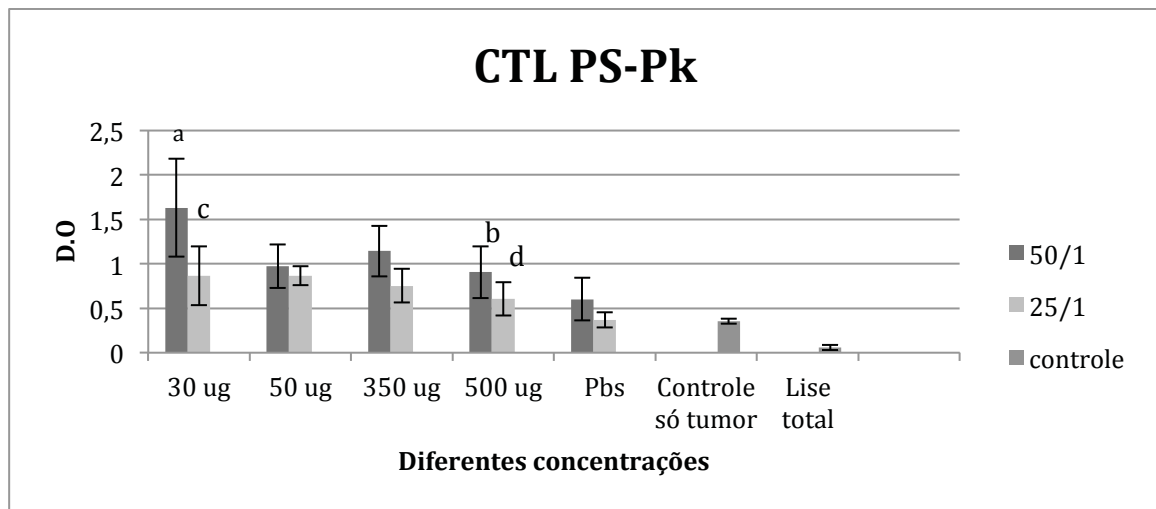


Figura 12- Ensaio de viabilidade tumoral por MTT nas concentrações de linfócito de 50:1 e 25:1.

ANOVA $a \neq b$ e $c \neq d$.

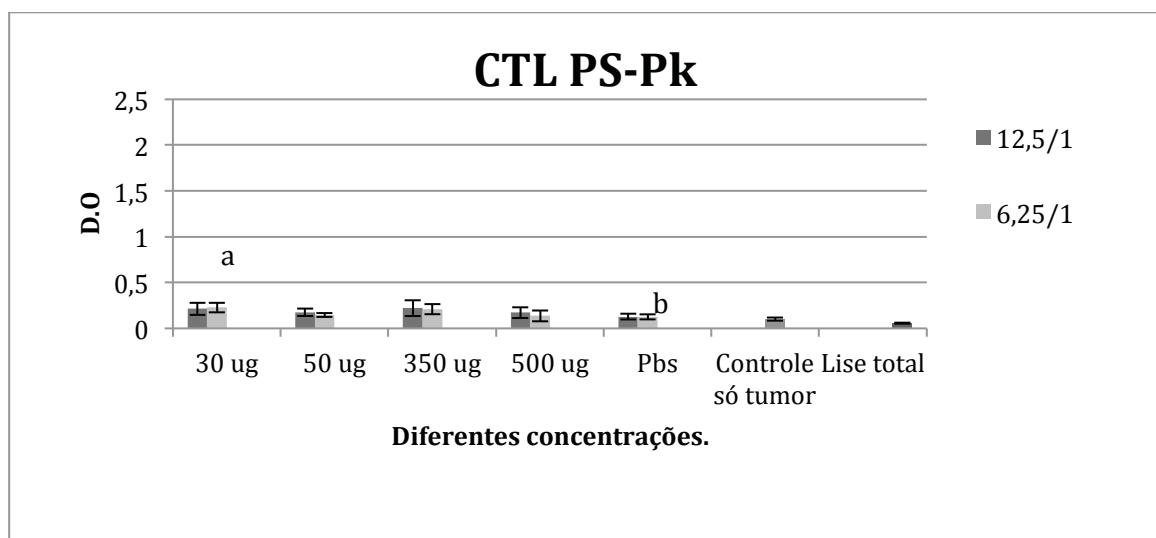


Figura 13 -Ensaio de viabilidade tumoral por MTT nas concentrações de linfócito de 12,5:1 3 6,25:1;

$a \neq b$.

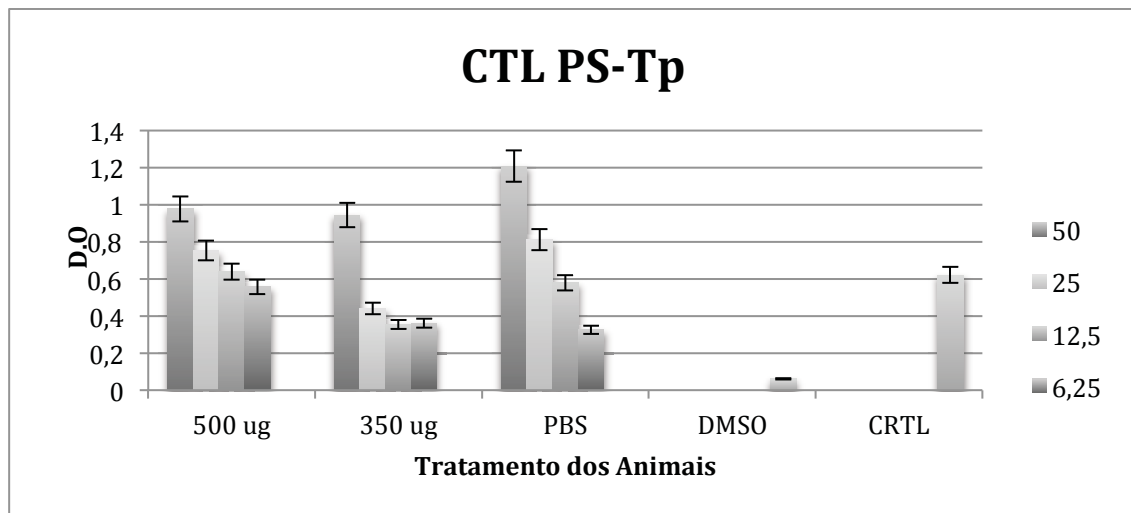


Figura 14 - Ensaio de viabilidade tumoral por MTT nas concentrações de linfócito de 12,5:1 3 6,25:1. Sendo que, não foi observado valores estatisticamente diferente $p=0,524$ (ANOVA).

3.9. Quantificação de citocinas.

Quantificação de citocinas (IL-10 e IFN- γ) foi feita pela técnica de ELISA indireto, no sobrenadante da co-cultura dos linfócitos do baço com células CT-26. Observamos menor concentração de INF- γ no sobrenadante do grupo tratado com PS-Pk em relação ao controle de tratamento, ainda que sem diferença estatística (Fig.15). Quanto a dosagem da IL-10 não se observou diferença em sua produção entre os grupos tratados e o controle (Fig.16).

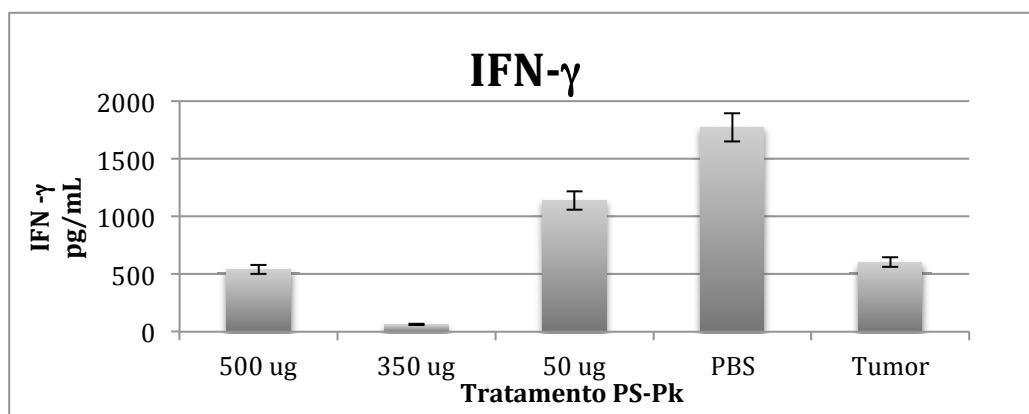


Figura 15 – Dosagem de INF- γ presente sobrenadante da co-cultura de linfócitos de animais tratados com PS-Pk e CT-26. Determinação realizada pelo método de ELISA; $n=12$.

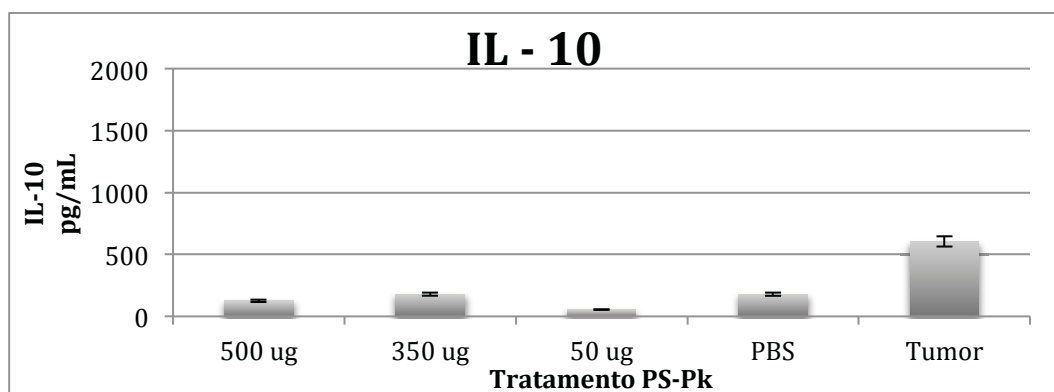


Figura 16 - Dosagem de IL-10 presente sobrenadante da co-cultura de linfócitos de animais tratados com PS-Pk e CT-26. Determinação realizada pelo método de ELISA; n=12.

Quanto a dosagem dessas citocinas no sobrenadante de linfócitos dos animais tratados com PS-Tp, observamos que não houve produção citocina IFN- γ (Fig. 26).

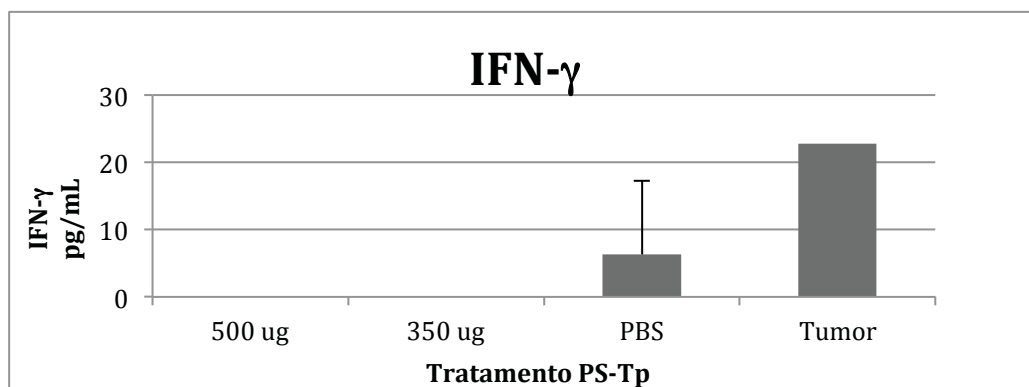


Figura 17 – Dosagem de INF- γ presente no sobrenadante da co-cultura dos linfócitos de animais tratados com PS-Tp. Determinação realizada pelo método de ELISA; n=4.

Entretanto notamos alta presença de IL-10 no sobrenadante dos animais tratados com 350 μ g da toxina tratada com PS-Tp (Fig. 18).

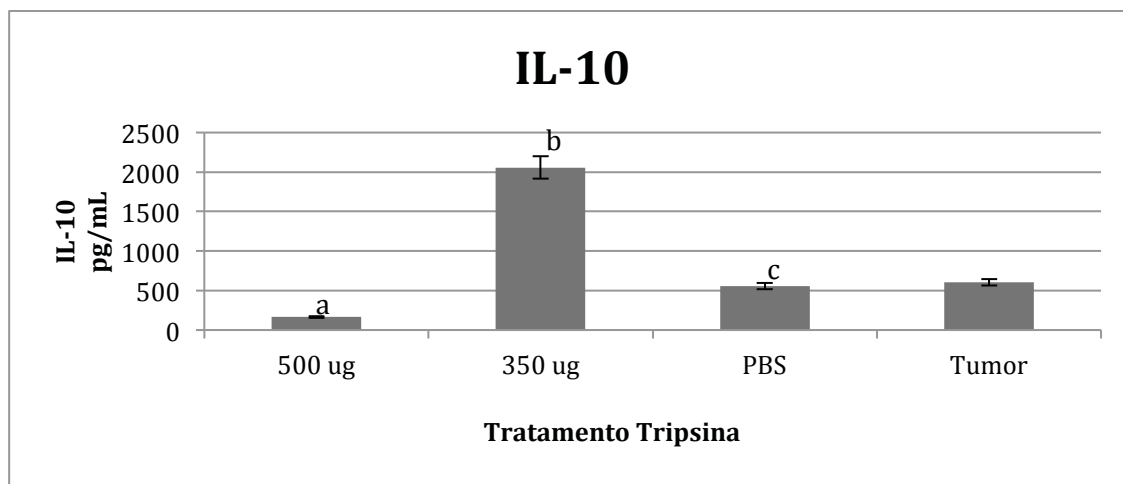


Figura 18 - Dosagem de IL-10 presente no sobrenadante da co-cultura dos linfócitos de animais tratados com PS-Tp. Segundo ANOVA $p < 0,001$, seguido pelo teste de Tukey notamos que $a \neq c$ e $b \neq c$.

3.10. Análise Histológica.

Amostras dos tumores ectópicos e do fígado e baço foram coletados, fixados em formalina tamponada a 4% e processadas para obtenção de cortes histológicos. Cortes com 5 micras de espessura foram submetidos a coloração de hematoxilina-eosina. Alterações histológicas hepáticas e esplênicas foram identificadas utilizando-se de critérios estabelecidos pela literatura [30-31].

A Figura 19A mostra uma fotomicrográfica de baço com aspecto normal com áreas de polpa branca e vermelha. Na Figura 19B e 19C de animal não tratado observa-se áreas com aumento no número de megacarioblastos/megacariócitos e áreas de intensa hematopoese extra medular destacando a presença de bastonetes. No fígado desse animal também foram observado focos de hematopoese extra medular (Figura 19D). A hematopoese extra medular em ambos órgãos foi observada em animais tratados por PS-Pk, PS-Tp e não tratados.

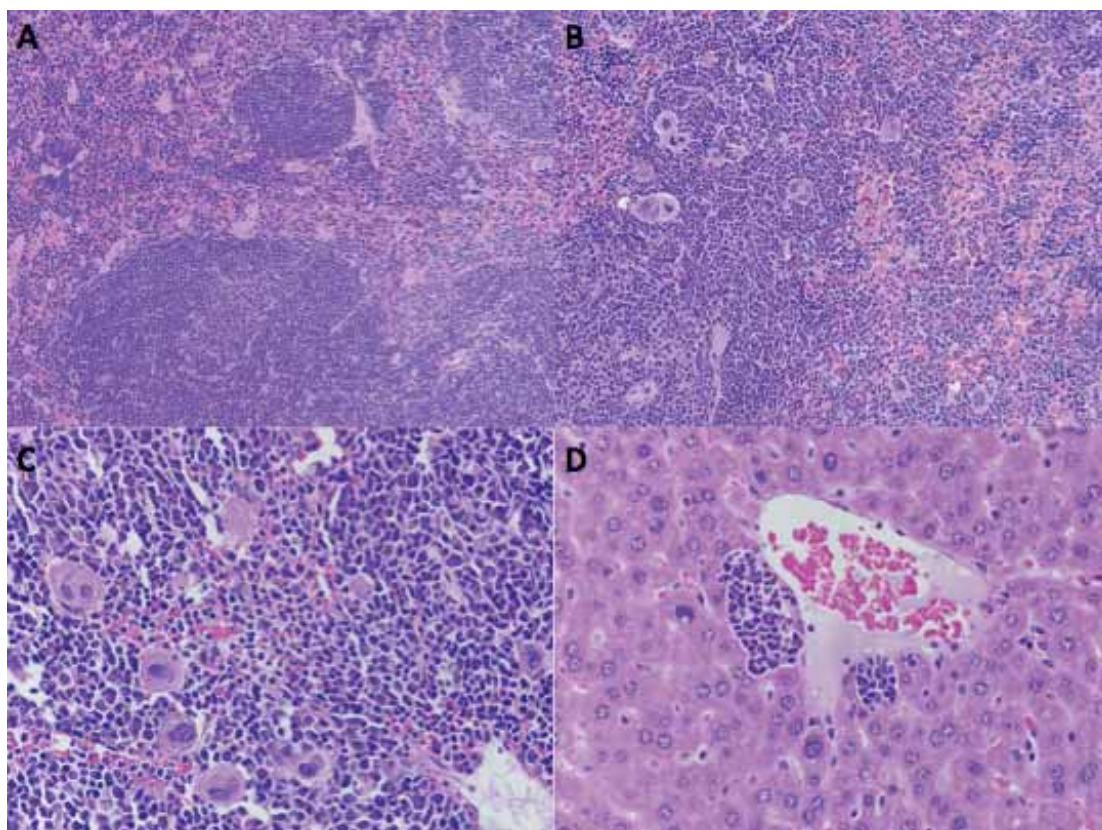


Figura 19- Fotomicrográfica de baço **A)** Animal normal. **B e C)** Animais tratados com salina. **D)** Fotomicrográfica do fígado de animais tratados com salina.

A Figura 20A mostra uma fotomicrográfica de um tumor ectópico com áreas vivas e necróticas e em 20B com aumento de maior observamos área de células tumorais viáveis e em expansão.

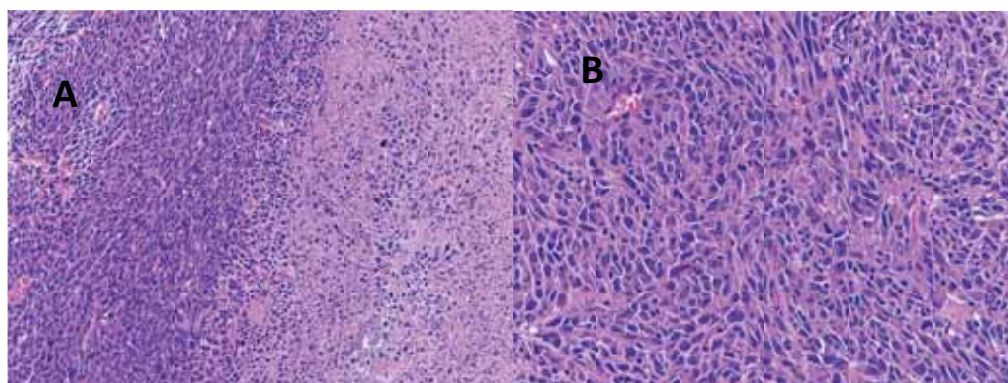


Figura 20 – **A)** Fotomicrográfica de um tumor ectópico (objetiva de 20x). **B)** um aumento de maior aumento (objetiva de 40x).

4.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO

O padrão de cristais de parasporina utilizados em nosso estudo sugere a presença de Cry8Ba, Cry19Ba, Cry24Aa e Cry41Aa1e a caracterização eletroforética

indica que trabalhamos com cristais de parasporina-3(PS3Aa1), descrita em 2005 por Yamashita et. al. Essa parasporina é considerada altamente citotóxica para linhagens tumorais humanas de leucemia mielóide (HL60) e câncer hepático (HepG2) com baixa toxicidade para células humanas normais. A PS3Aa1 exibe estrutura de três domínios, sendo que apresentam conformação semelhante aos cristais com ação inseticida, resultando na hipótese de que a ação antitumoral exercida por esse cristal pode ser análoga ao modo de ação inseticida. Assim, presume-se que haja a formação de poros na membrana plasmática de células tumorais e essa hipótese é sustentada pelo fato de se ocorre aumento do volume plasmático e de permeabilidade na membrana das células tratadas com PS3Aa1 [13]. Entretanto, são poucos os estudos que analisam o mecanismo citotóxico dessa proteína e não há relatos na literatura quanto a ação citotóxica da PS3Aa1 frente a linhagem de câncer colorretal murino CT-26.

Assim, inicialmente observamos que, em contraste com as células Caco-2 (também de carcinoma colorretal humano [3], as células CT-26 de câncer de cólon murino foi sensível á ação citotóxica da parasporina usada em nosso estudo, com maior atividade a partir de 50 ug/ml. Durante a fase inicial de nossos estudos observamos que outra linhagem de células de carcinoma colorretal humano, HCT-116, também se mostrou sensível a essa proteína (dados não mostrados). É possível que a diferença em relação às células Caco-2 se deva à características de sensibilidade de cada uma das células estudadas. Outra possibilidade é que a preparação utilizada em nosso estudo apresente maior amplitude de ação do que aquela usada por Ohba et al. [3]. Tal possibilidade só poderá ser esclarecida, testando-se nossos produtos com a referida célula.

Entretanto nossa principal pergunta era se essa toxina seria capaz de exercer atividade antitumoral *in vivo*, razão pela qual prosseguimos o estudo apenas com as células murinas CT-26. Primeiramente observamos que tanto a administração subcutânea peritumoral quanto a via intraperitoneal provocaram efeitos deletérios ao hospedeiro, sendo que a inoculação s.c peritumoral mostrou toxicidade mais intensa do que a i.p, visto que a sobrevida dos animais portadores de tumor foi ligeiramente superior nesse grupo.

Além do efeito tóxico observado nos animais inoculados com PS-Pk, essa parasporina não se mostrou capaz de inibir o crescimento tumoral *in vivo*, observando-se até a aceleração do crescimento em alguns dos animais. A preparação com tripsina, embora menos tóxica, também não apresentou atividade antitumoral *in vivo*. Além disso, notamos que o grupo que recebeu a dose mais baixa (50 mg) não resistiu até o término do experimento.

Ao contrário de nossas expectativas, observamos o desenvolvimento de espleno-hepatomegalia e alta taxa de mortalidade nos animais tratados com as preparações de parasporina. A esplenomegalia parece estar diretamente relacionada à quantidade de toxina administrada. Além disso, foi observada uma redução na atividade motora dos animais, fraqueza no tônus muscular, perda de reflexos básicos e pelo arrepiado comprovando a toxicidade das preparações, nas doses utilizadas no estudo.

A redução da concentração da dose de PS-Pk para 20, 5 e 1 µg/100µL nos ensaios seguintes, com o intuito de minimizar os efeitos toxicológicos não se mostrou trouxe reflexo positivo sobre a sobrevida dos animais. Resultado semelhante foi observado nos animais tratados com baixas doses de PS-Tp. Além disso, nessa nova condição de tratamento, os animais pareciam mais debilitados, apresentando sinais

como perda de peso em um curto período de tempo e redução do padrão de alimentação, além de caquexia e morte antes do período planejado para a finalização do estudo. O prejuízo ao estado geral dos animais foi observado também nos controles de tratamento em animais não portadores do tumor, comprovando que a toxicidade é causada pela parasporina e não pela presença do tumor.

Em vista da hepatomegalia provocada pela toxina administrada nas doses mais elevadas, procuramos investigar a extensão dos danos causados pela toxina por parâmetros bioquímicos de função hepática. Fizemos a determinação da concentração sérica de alanina aminotransferase (ALT), uma vez que esta é encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma de hepatócitos, o que torna o seu aumento sérico um indício de lesão hepática. Também analisamos a concentração de aspartatoaminotransferase (AST), pois esta é encontrada em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias de células hepáticas, músculo esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos, indicando dano em qualquer um desses tecidos. Não havendo um método laboratorial para se identificar a origem exata da AST sérica, deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada. Assim, observa-se o aumento ou diminuição tanto da AST quanto da ALT em doenças hepáticas. Elevações discretas de ambas, ou apenas de ALT em pequena proporção, são indicadores de hepatite crônica em humanos (especialmente hepatite C e esteato-hepatite não alcoólica) enquanto elevações da concentração sérica de ambas são observadas em hepatites agudas virais ou induzidas por drogas [24-26].

Sendo assim, notamos que os animais tratados por ambos os preparados demonstraram valores acima daqueles de referencia dessas enzimas, indicando que as concentrações da toxina podem causar hepatite aguda, com destaque para a dose de 500 µg da PS-Tp e 350 µg de PS-Pk. Diferentemente, na concentração de 350 µg do

preparado de PS-Tp observamos uma queda dos níveis de ambas as enzimas, sugerindo um quadro de hepatite crônica[27].

A presença do tumor poderia ser responsável pelas alterações dos níveis de AST e ALT, no entanto, observamos que o grupo controle de tumor (com tumor e sem tratamento) não diferiu significativamente dos valores de referência, enquanto os animais tratados apenas com a PS-Pk, na ausência de tumor, tiveram aumento das taxas enzimáticas, indicando o efeito hepatotóxico agudo da parasporina.

Com o intuito de verificar lesão renal e confirmar os danos hepáticos, realizamos a dosagem de uréia enzimática sérica [26]. Nesse ensaio, notamos que ambos os preparados da toxina causam depleção desta enzima no soro, indicando um estado de hepatopatia grave. Assim, quando o fígado está lesado é incapaz de sintetizar uréia a partir do amônio, resultante do metabolismo proteico, levando a formação de amônia sanguínea, que pode causar encefalopatia hepática. Assim, a administração de PS-Pk provocou a diminuição da enzima sérica, reforçando a hipótese de hepatotoxicidade aguda (referências que sustentem a discussão). A administração de 350 µg de PS-Tp provocou aumento na concentração sérica de uréia enzimática, sugerindo uma possível enfermidade renal como lesões glomerular, tubular, intersticial ou vascular, fatores que poderiam ser responsáveis pelo aumento dessa enzima no soro.

No entanto, não observamos diferença histológica quanto à morfologia dos tumores ectópicos, fígado e baço entre os grupos tratados com os preparados de PS-Pk, PS-Tp e PBS (salina). Sendo que, observamos grandes zonas necróticas e fígado demonstrando extensa ativação retículo endotelial semelhante à encontrada em choque séptico.

Em vista da esplenomegalia observada nos animais tratados com a parasporina

investigamos também o efeito imunotóxico dos preparados de parasporina. A análise da atividade citotóxica dos esplenócitos dos animais (com tumor) tratados com PS-Pk mostra ausência de atividade lítica sugerindo depleção linfocitária ou interferência na atividade dessas células. O tratamento com PS-Tp teve efeito menos drástico, porém a atividade lítica dos esplenócitos também foi afetada por essa toxina.

A imunotoxicidade da parasporina estudada foi confirmada pela redução dos níveis de INF- γ gerado *in vitro* pelos esplenócitos uma citocina essencial para o estabelecimento de uma resposta imune antitumoral eficiente [28-29].

Quanto à dosagem de IL-10 não se observou diferença em sua produção entre os grupos tratados com PS-Pk e seu controle. No entanto, notamos elevada produção dessa citocina no sobrenadante dos animais tratados com 350 μ g da PS-Tp. Wei et al. demonstraram que a produção de IL-10 pode auxiliar o desenvolvimento de linfócitos T reguladores (Treg), um dos responsáveis pela inibição da resposta contra antígenos associados ao tumor (TAA) pelas células T. Assim, esse efeito imunotóxico pode ter contribuído para reduzir a resistência do hospedeiro ao crescimento tumoral[32].

Nossos resultados mostram, pela primeira vez, que a parasporina tem atividade antitumoral relevante nos ensaios *in vitro*, mas não combate o crescimento tumoral *in vivo*. Ao contrário, a proteína se mostrou altamente tóxica, afetando fígado e baço, com possível reflexo em outros órgãos, diminuindo a sobrevivência dos animais tratados.

Há que se considerar que os resultados de toxicidade *in vivo* não invalidam o potencial de uso das parasporinas como agente antineoplásicos, mas requerem estudos para detoxificação ou manipulação dos preparados para uso terapêutico. Uma das alternativas de estudo seria o uso de nanopartículas para o transporte das toxinas para

o sítio tumoral, minimizando os efeitos tóxicos em órgãos e tecidos normais do hospedeiro.

Por outro lado, consideramos que o aspecto mais importante do presente estudo reside no fato de que os cristais proteicos produzidos por *B. thuringiensis* são usadas como inseticidas, tendo seu uso permitido inclusive para a agricultura orgânica. É possível que as concentrações da toxina aplicadas nas culturas sejam muito inferiores às utilizadas em nosso estudo, mas deve se questionar se a exposição repetitiva dos trabalhadores que fazem a aplicação não poderia provocar prejuízos hepáticos e imunológicos semelhantes aos observados neste estudo.

5. REFERÊNCIAS

1. Yasutake, K., et al., *Identification of parasporin genes in Vietnamese isolates of Bacillus thuringiensis*. Z Naturforsch C, 2008. **63**(1-2): p. 139-43.
2. Guo, G., et al., *A new group of parasporal inclusions encoded by the S-layer gene of Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **282**(1): p. 1-7.
3. Ohba, M., E. Mizuki, and A. Uemori, *Parasporin, a new anticancer protein group from Bacillus thuringiensis*. Anticancer Res, 2009. **29**(1): p. 427-33.
4. Gonzalez, E., et al., *Parasporins from a Caribbean Island: evidence for a globally dispersed Bacillus thuringiensis strain*. Curr Microbiol. **62**(5): p. 1643-8.
5. Okumura, S., et al., *Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of Bacillus thuringiensis expressed as inclusion bodies in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2006. **47**(1): p. 144-51.
6. Ito, A., et al., *A Bacillus thuringiensis crystal protein with selective cytotoxic action to human cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21282-6.
7. Poornima, K., P. Selvanayagam, and R. Shenbagarathai, *Identification of native Bacillus thuringiensis strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells*. J Appl Microbiol. **109**(1): p. 348-54.
8. Nadarajah, V.D., et al., *Selective cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquitocidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2008. **39**(2): p. 235-45.
9. Lee, D., et al., *A 28 kDa protein of the Bacillus thuringiensis serovar shandongensis isolate 89-T-34-22 induces a human leukemic cell-specific cytotoxicity*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1547**(1): p. 57-63.

10. Nagamatsu, Y., et al., *Three Cry toxins in two types from Bacillus thuringiensis strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells*. Biosci Biotechnol Biochem. **74**(3): p. 494-8.
11. Bravo, A., et al., *Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide*. Insect Biochem Mol Biol. **41**(7): p. 423-31.
12. Mizuki, E., et al., *Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of Bacillus thuringiensis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2000. **7**(4): p. 625-34.
13. Yamashita S, Katayama H, Saitoh H, Akao T, Park YS, Mizuki E, Ohba M and Ito A: Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. J Biochem **138**: 663-672, 2005.
14. Katayama, H., et al., *Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from Bacillus thuringiensis, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7742-52.
15. Katayama, H., et al., *Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of Bacillus thuringiensis*. J Biochem, 2005. **137**(1): p. 17-25.
16. Uemori, A., et al., *Parasporin-1Ab, a novel Bacillus thuringiensis cytotoxin preferentially active on human cancer cells in vitro*. Anticancer Res, 2008. **28**(1A): p. 91-5.
17. Uemori, A., et al., *Ubiquity of parasporin-1 producers in Bacillus thuringiensis natural populations of Japan*. Naturwissenschaften, 2007. **94**(1): p. 34-8.
18. Akiba, T., et al., *Crystallization of parasporin-2, a Bacillus thuringiensis crystal protein with selective cytotoxic activity against human cells*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 2): p. 2355-7.
19. Kitada, S., et al., *Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells*. Toxicology, 2009. **264**(1-2): p. 80-8.
20. Hayakawa, T., et al., *Parasporin-2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from Bacillus thuringiensis*. Curr Microbiol, 2007. **55**(4): p. 278-83.
21. Okumura, S., et al., *Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by Bacillus thuringiensis A1470 strain*. Biotechnol Annu Rev, 2008. **14**: p. 225-52.
22. Okumura, S., et al., *Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from Bacillus thuringiensis*. Biochim Biophys Acta. **1808**(6): p. 1476-82.
23. Kaneno, R., et al., *Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells*. Cell Oncol (Dordr). **34**(2): p. 97-106
24. Feng JF, C.T., Wen YA, Wang J, Tu ZG., *Study of serum argininosuccinate lyase determination for diagnosis of liver diseases*. J Clin Lab Anal., 2008. **22**(3): p. 220-7.
25. Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Brussl, M. L., *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* , 2008, p.896
26. Motta, V.T., *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações*.**15**: p. 232-246.
27. Jorge, S.G., *Hepatologia Médica. Exames laboratoriais*. 2006

28. Taniguchi K, Petersson M, Hoglund P, Kiessling R, Klein G, Karre K (1987) Interferon gamma induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(10):3405–3409
29. Garbe C, Krasagakis K, Zouboulis CC, Schroder K, Kruger S, Stadler R, Orfanos CE (1990) Antitumor activities of interferon alpha, beta, and gamma and their combinations on human melanoma cells in vitro: changes of proliferation, melanin synthesis, and immunophenotype. *J Invest Dermatol* 95(6 Suppl):231S–237S
30. Elmore SA. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):648–55.
31. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, Malarkey DE, Kaufmann W, Küttler K, Deschl U, Nakae D, Gregson R, Vinlove MP, Brix AE, Singh B, Belpoggi F, Ward JM. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol.* 2010 Dec;38(7 Suppl):5S–81S. Review.
32. Wei, S., Wilke, C. M., Wang, L., Kryczek, I., Zou, W., Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011.

6. ANEXOS



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 347-CEUA, sobre "ATIVIDADE ANTITUMORAL DE PARASPORINA EXTRAÍDA DE *B. thuringiensis* SOBRE O CÂNCER COLORRETAL MURINO (CT-26)", sob a responsabilidade de **Ramon Kaneno**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 24 de outubro de 2011.


Profª Drª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente da CEUA

Instituto de Biologia - Instituto Técnico Acadêmico
Departamento de Biologia - Av. CP 186 - 130 Botucatu SP Brasil
Tel: 14 320 225/226 Fax: 14 320 2746 e-mail: dte@ibot.unesp.br

Figura 21 – Certificado de aprovação "Ad referendum" da Comissão de ética no uso de animais (CEUA).