



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**Detecção e Caracterização de Proteínas**  
**Parasporinas em *Bacillus thuringiensis***

**ELIAS FERREIRA SABIÁ JÚNIOR**

BRASÍLIA

2015

ELIAS FERREIRA SABIÁ JÚNIOR

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS  
PARASPORINAS EM *Bacillus thuringiensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Rose Gomes  
Monnerat

Co-Orientador: Prof. Dr. José R. Corrêa

BRASÍLIA

2015

ELIAS FERREIRA SABIÁ JÚNIOR

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS  
PARASPORINAS EM *Bacillus thuringiensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Rose Gomes Monnerat (Presidente)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cynthia Maria Kyaw (Membro efetivo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joseilde Oliveira Silva Werneck – Embrapa (Membro efetivo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Membro suplente)

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.” (Leonardo da Vinci)*

## AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio e suporte, em especial meus pais, Elias e Celes, minha irmã Juliana, minha tia Conceição, meus avós Perpeton (*in memoriam*) e Cleonice, e minhas duas princesas e sobrinhas, Bárbara e Beatriz. Amo vocês!

À minha amiga e namorada Nina, pelo companheirismo, por estar presente em todos os momentos, me apoiando e sempre me dando forças, pela sua enorme paciência, me alegrando e me trazendo paz e serenidade. Obrigado por me proporcionar momentos únicos. Amo você!

À minha querida orientadora Dr<sup>a</sup>. Rose Monnerat, pela oportunidade de fazer parte de um grupo tão seletivo quanto o grupo do LBE, por seus conselhos, pela amizade, paciência, confiança, pelo exemplo de profissional, pesquisadora e mãe. Não tenho palavras para agradecer. Obrigado por tudo!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Raimundo, por ter me aceitado no seu grupo, pelos seus sábios conselhos em experimentos e no projeto.

À Dr<sup>a</sup>. Joseilde (mãe Jô), que me encaminhou no mundo da pesquisa, me ajudou a dar os primeiros passos nessa profissão tão bela e única, sempre com muita paciência e carinho.

Aos amigos e companheiros de bancada do LBE (Laboratório de bactérias entomopatogênicas), Flávia, Marcelo, Sandro, Marina, Anabele, Briana, Fernanda, Mayco, Rayane, Ester, os pesquisadores Marcelo e Bárbara e a todos os outros amigos que passaram pelo LBE, por todos os momentos divertidos, idas a congressos, conversas descontraídas, trocas de experiências e aprendizado coletivo. Ao Zezinho pela grande ajuda no preparo de soluções, meios e na lavagem dos materiais. À Lílian, por toda a ajuda, paciência e amizade durante todos os anos que estou no LBE. Ao Casal Érica e Paulo, pelo seu ânimo e disposição para nos ajudar, pelo exemplo de pesquisadores e casal, e por todos esses anos de amizade. Agradeço especialmente à Carlinha e Cris, minhas companheiras do dia-a-dia por sempre estarem quebrando meus galhos, me ajudando, e pela amizade que pudemos construir durante esses anos de pesquisa. Agradeço muito a todos pela oportunidade de fazer parte desse grupo de que me orgulho muito!

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica por todos os ensinamentos, apoio, ajuda e, acima de tudo, paciência, durante os períodos em que dividíamos a sala de experimentação e de cultura de células, em especial Yasmin, Dani, Natalia, Lorena, Núbia, Bruna, Rafa, Cláudio e Joseilma.

Aos amigos do Laboratório de Virologia da UnB, em especial Professor Bergmann, Roberto, Daniel, Fabrício, Léo, Débora e Fernando por sempre estarem dispostos a ajudar e auxiliando com equipamentos e reagentes.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Cenargen, em especial à Dr<sup>a</sup>. Débora e à Renata, por estarem sempre dispostas a ajudar nos experimentos e utilização de equipamentos.

Aos meus amigos de escola, Thiago, Daiane, Camila e Andressa, pelo companheirismo mesmo com a distância e as correrias da vida.

Ao grupo dos Manos, Victor, Ronan, Josué, Bilika, Petrônio, Raul, Caio, Vítinha e Thiago, por todas as conversas sobre a vida, os encontros, momentos de descontração, conselhos e a amizade. Valeu manos!

Aos amigos do Semestre mais legal, que desde o início da graduação fazem parte da minha vida. Obrigado por dividirem momentos tão bons e loucos comigo!

Ao curso de Biologia, pelas amizades, o conhecimento adquirido, pelas viagens, curtidas e estudos em grupo.

À Universidade de Brasília e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

À Capes e ao programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A bactéria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) é amplamente conhecida devido à sua grande importância no controle biológico, graças à sua capacidade de produzir inclusões cristalinas formadas por proteínas inseticidas (Cry e Cyt), ativas contra um amplo espectro de insetos. Uma nova atividade foi relatada para cristais sem atividade inseticida, a citotoxicidade contra células cancerosas humanas. Essas proteínas citotóxicas, chamadas de Parasporinas (PS), não são hemolíticas e são estruturalmente diferentes das proteínas Cry e Cyt. Até o momento, seis grupos de PS foram identificadas, com base na homologia das suas sequências de aminoácidos. As Parasporinas apresentam modo de ação diferente entre as famílias, assim como diferente espectro citotóxico e nível de atividade. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui uma Coleção de *Bacillus* spp. que conta com aproximadamente 2500 isolados. Esse trabalho teve como objetivo identificar, entre as estirpes dessa coleção, genes da família de Parasporinas através de diferentes marcadores moleculares, analisar o perfil proteico dessas estirpes, a possível produção de  $\beta$ -exotoxinas, avaliar sua toxicidade para linhagens de células tumorais, analisar a influência dessas proteínas no padrão de migração celular de linhagens de câncer e as possíveis alterações morfológicas causadas pelas toxinas Parasporinas nas células tumorais suscetíveis. Duzentos e sessenta e nove estirpes foram selecionadas aleatoriamente do banco de bactérias e triadas com os iniciadores específicos desenhados para identificação dos diferentes genes de Parasporina. Trinta e cinco estirpes apresentaram padrões de amplificação para esses genes, dentre estes, 30 isolados obtiveram amplificações para o gene *parasporina 1*, enquanto 5 isolados para o gene *parasporina 3*. O perfil proteico sugere que as proteínas secretadas por algumas estirpes possuem o tamanho esperado para o grupo de Parasporina (aproximadamente 81 e 88 kDa para as famílias 1 e 3, respectivamente). Nenhuma das estirpes positivas por PCR apresentou produção de  $\beta$ -exotoxinas. As proteínas das estirpes testadas não mostraram toxicidade contra as linhagens tumorais DU-145 e HeLa. A proteína PS1 da estirpe S1338 mostrou toxicidade específica a células tumorais de mama MCF-7, alterando sua morfologia após 24 horas do tratamento com a toxina ativa, sugerindo que o tipo de morte celular envolvendo a Parasporina 1 seja por apoptose. Nenhuma alteração significativa no padrão de migração das células MCF-7 pode ser observada após o tratamento com a toxina. Desta

forma, nossos dados sugerem que a Parasporina 1 produzida pela estirpe S1338 possui características únicas e especificidade contra a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama. Estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação desta toxina, bem como sobre o possível receptor nas células suscetíveis, poderão tornar viável a utilização das Parasporinas como terapia alternativa para o tratamento de câncer, ou até mesmo como ferramenta molecular para o diagnóstico dessa doença.

**Palavras-chave:** Parasporina; *Bacillus thuringiensis*; Câncer; Células MCF-7.



## ABSTRACT

The Gram-positive bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) is widely known for its importance on biological control, due to their ability to produce crystalline inclusions formed by insecticide proteins (Cry e Cyt), active against a broad range of insects. A new activity was reported for crystals without insecticide activity, the cytotoxic against human cancer cells. These cytotoxic proteins are known as Parasporins (PS), are not hemolytic and have different structure from the Cry and Cyt proteins. So far, six classes of PS were identified, based on the homology of their aminoacids sequences. The Parasporins have different mode of action among theirs families, as well as different cytotoxic range and level of activity. The Embrapa Genetic Resources and Biotechnology has a collection of *Bacillus* spp. with approximately 2500 isolates. This work aims to identify, among the strains of this collection, genes of Parasporin families through different molecular markers, analyse the protein profile of strains, the possible production of  $\beta$ -exotoxins, evaluate its toxicity to tumor cells line and the possible morphological changes caused by the toxins Parasporins in susceptible tumor cells. Two hundred and sixty-nine strains were selected randomly on the bacteria bank, and were screened with specific primers to identify the different Parasporin genes. Thirty-five strains showed amplification patterns, of which, 30 isolates showed amplification to the *parasporin 1* gene, and other 5 isolates to *parasporin 3* gene. The protein profile suggested that the secreted proteins by some strains has the expected size to the group of Parasporin (approximately 81 and 88 kDa for the family 1 and 3, respectively). None of the positive strains identified by PCR showed  $\beta$ -exotoxins production. The protein of the tested strains didn't show toxicity against tumor lines DU-145 and HeLa. The protein PS1 from the strain S1338 showed specific toxicity against breast cancer cells MCF-7, changing their morphology after 24 hours of treatment with active toxin, suggesting that the type of cell death involving Parasporina 1 is through apoptosis. No significant alteration in the patterns of MCF-7 cell migration could be observed after treatment with the toxin. Therefore, our data suggest that Parasporin 1 from S1338 strain has unique characteristics and specificity against MCF-7 cell line of breast adenocarcinoma. Further studies on the mode of action involving this toxin, and the possible receptor of susceptible cells, can make the use of Parasporin feasible as an

alternative therapy in cancer treatment, or even as a molecular tool for the diagnosis of the disease.

**Keywords:** Parasporin; *Bacillus thuringiensis*; Cancer; MCF-7 cell line.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	v
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÍNDICE GERAL .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	18
1.2 Parasporinas.....	24
1.2.1 Parasporina 1 (Cry31).....	25
1.2.2 Parasporina 2 (Cry46).....	26
1.2.3 Parasporina 3 (Cry41).....	28
1.2.4 Parasporina 4 (Cry45).....	28
1.2.5 Parasporina 5 e 6 (Cry64 e Cry 63) .....	28
1.2.6 Estrutura Tridimensional das Parasporinas 2 e 4.....	29
1.3 Câncer.....	32
1.3.1 Câncer de Mama.....	35
1.3.2 Câncer de Próstata .....	37
1.3.3 Câncer do Colo do Útero .....	40
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	42
<b>3. OBJETIVO</b> .....	43
3.1 Objetivo Geral .....	43
3.2 Objetivos Específicos .....	43
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
4.1 Estirpes de Bt e condições de cultivo .....	44
4.2 Cultivo de linhagens celulares de mamíferos .....	47
4.2.1. Descongelamento de células.....	48
4.2.2. Passagem de células.....	48
4.3 Extração de DNA de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	49
4.4 Desenho dos iniciadores .....	49

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	49
4.6 Solubilização e ativação das toxinas a partir dos cristais .....	50
4.7 Análise do perfil proteico por SDS-PAGE.....	50
4.8 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	51
4.9 Detecção de $\beta$ -exotoxinas.....	51
4.10 Ensaio de viabilidade celular.....	51
4.11 Cálculo para determinação da concentração inibitória 50 (IC <sub>50</sub> ) .....	52
4.12 Análise das alterações morfológicas.....	52
4.13 Ensaio de “Wound Healing”.....	53
4.14 Bioensaios com insetos-praga .....	53
4.14.1 Bioensaio seletivo contra <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Aedes aegypti</i> .....	54
4.14.2 Bioensaio seletivo contra <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	54
4.14.3 Bioensaio seletivo contra <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	54
4.14.4 Bioensaio seletivo contra <i>Plutella xylostella</i> .....	55
4.15 Análises Estatísticas .....	55
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
5.1 Desenho dos iniciadores .....	56
5.2 PCR.....	56
5.3 Detecção de $\beta$ -exotoxinas.....	58
5.4 Análise do perfil proteico por SDS-PAGE.....	58
5.5 Ensaio de Viabilidade Celular .....	61
5.6 Caracterização morfológica dos cristais por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	65
5.7 Análise das alterações morfológicas .....	66
5.8 Determinação do IC <sub>50</sub> .....	69
5.9 Ensaio de “Wound Healing” .....	70
5.10 Bioensaio seletivo contra <i>C. quinquefasciatus</i> , <i>A. aegypti</i> , <i>S. frugiperda</i> , <i>A. gemmatalis</i> e <i>P. xylostella</i> .....	73
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>76</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Visão esquemática mostrando o espectro de ação das $\delta$ -endotoxinas de Bt. .	20
<b>Figura 2.</b> Visão esquemática do atual Sistema de nomenclatura usado pelo Comitê de Nomenclatura de Toxinas de Bt para $\delta$ -endotoxinas e toxinas secretáveis .....	21
<b>Figura 3.</b> Modo de ação da proteína Parasporina 1 .....	26
<b>Figura 4.</b> Modo de ação da proteína Parasporina 2 .....	27
<b>Figura 5.</b> Comparação estrutural entre Parasporina 2, a proteína não tóxica de 26 kDa e proteínas formadoras de poro do tipo $\beta$ .....	31
<b>Figura 6.</b> Estimativa de casos de tumores no Brasil para o ano de 2014 .....	33
<b>Figura 7.</b> As dez capacidades adquiridas do câncer propostas por Hanahan e Weinberg. ....	35
<b>Figura 8.</b> Produtos de PCR para genes <i>parasporina</i> de estirpes de <i>B. thuringiensis</i> . ...	57
<b>Figura 9.</b> Perfil eletroforético das proteínas solubilizadas extraídas das estirpes positivas para Parasporina 1 .....	59
<b>Figura 10.</b> Perfil eletroforético das proteínas solubilizadas extraídas das estirpes positivas para Parasporina 3 .....	60
<b>Figura 11.</b> Ensaio de viabilidade celular com diferentes concentrações de proteínas de Bt contra as linhagens DU-145, MCF-7 e HeLa .....	64
<b>Figura 12.</b> Ensaio de viabilidade com diferentes concentrações de proteína da estirpe S1338 contra a linhagem de Fibroblasto de polpa dental e a linhagem de Câncer de Mama MCF-7 .....	64
<b>Figura 13.</b> Ensaio de viabilidade com diferentes concentrações de proteína da estirpe S1338 contra a linhagem MDA-MB-231 .....	65
<b>Figura 14.</b> Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporo/cristal da estirpe de Bt S1338.....	66
<b>Figura 15.</b> Alterações morfológicas em células MCF-7 após 24h de tratamento com Parasporina 1 da estirpe S1338.....	68

<b>Figura 16.</b> Cálculo para determinação do IC <sub>50</sub> da toxina de S1338 contra a linhagem de Câncer de Mama MCF-7. ....	69
<b>Figura 17.</b> Ensaio de “Wound Healing” .....	71
<b>Figura 18.</b> Análise das imagens capturadas em ensaio de migração de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de proteínas da estirpe S1338. ....	72

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características das parasporinas .....	25
<b>Tabela 2.</b> Estirpes testadas, sorotipo e local de isolamento.....	44
<b>Tabela 3.</b> Iniciadores específicos para os genes <i>parasporina</i> desenhados para utilização em estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> . .....	56
<b>Tabela 4.</b> Bioensaio utilizando as estirpes positivas para os genes <i>parasporina</i> contra lepidópteros e dípteros.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	deoxinucleotídeos
DU145	Linhagem celular de Câncer de próstata
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramas
x g	velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HeLa	Linhagem celular de Câncer de mama
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kb	quilobase = 1000 pares de bases
KCl	Cloreto de potássio
kDa	quilodalton
L	Litro
m/m	massa/massa
m/v	massa/volume
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
mg	Miligrama
µg	micrograma = 10 <sup>-6</sup> grama
µL	microlitro = 10 <sup>-6</sup> litro
Min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium



NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma = 10 <sup>-9</sup> grama
nL	nanolitro = 10 <sup>-9</sup> litro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
PBS	Tampão fostato salino
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PSA	Antígeno específico da Próstata
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	ribonuclease
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS
SFB	Soro fetal bovino
Subsp.	Subespécie
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade enzimática
v/v	volume/volume
WHO	World Health Organization
°C	grau Celsius
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
-	Menos

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Bacillus thuringiensis*

Dentre os diversos microorganismos conhecidos, as bactérias são as mais relevantes do ponto de vista científico e industrial (FEITELSON *et al.*, 1992). As famílias Bacillaceae, Paenibacillaceae, Streptococaceae e Achromobacteriaceae contêm as principais bactérias entomopatogênicas (ARONSON *et al.*, 1986).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria de solo, Gram positiva, aeróbia, podendo crescer também em anaerobiose e possui forma de bastonete (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Pode ser encontrada isolada, aos pares ou formando cadeias, apresentando de 0,5 a 2,5 µm de largura por 1,2 a 10 µm de comprimento (MIRALLES & PEREZ, 2004) além da maioria dos isolados possuírem flagelos peritríquios que permitem sua locomoção (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

O Bt é classificado como pertencente à Classe: Firmibacteria, Ordem: Eubacteriales, Família: Bacillaceae, gênero: *Bacillus* (WHITELEY & SCHNEPF, 1986). Dentro do Gênero *Bacillus*, *B. thuringiensis*, juntamente com *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis* e *B. wihenstephanensis*, formam o grupo *B. cereus*. Neste grupo, a maior semelhança de sequência de DNA ocorre entre *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (HELGASON *et al.*, 2000; GUINEBRETIERE *et al.*, 2008; KOLSTO *et al.*, 2009). *B. thuringiensis* e *B. cereus* apresentam características fenotípicas e bioquímicas comuns, mas por definição pode ser diferenciado pela presença de cristais (LUTHY & WOLFERSBERGER, 2000) visíveis em microscopia de contraste de fase (LYSENKO, 1983).

É uma bactéria cosmopolita (KRYWUNCZYK & FAST, 1980), podendo ser isolada de diversos substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha, grãos armazenados, folhas de árvores decíduas, mamíferos insetívoros e até mesmo de tecidos humanos com necrose (HÖFTE & WHITELEY, 1989; KNOWLES & DOW, 1993; BRAVO *et al.*, 1998; ROH *et al.*, 2007; RAYMOND *et al.*, 2010). Entretanto, seu requerimento nutricional vitamínico e de aminoácidos, como ácido glutâmico, sugere que as células vegetativas somente se reproduzem no interior dos insetos hospedeiros (SOBERON & BRAVO, 2001; MONNERAT & PRAÇA, 2006).

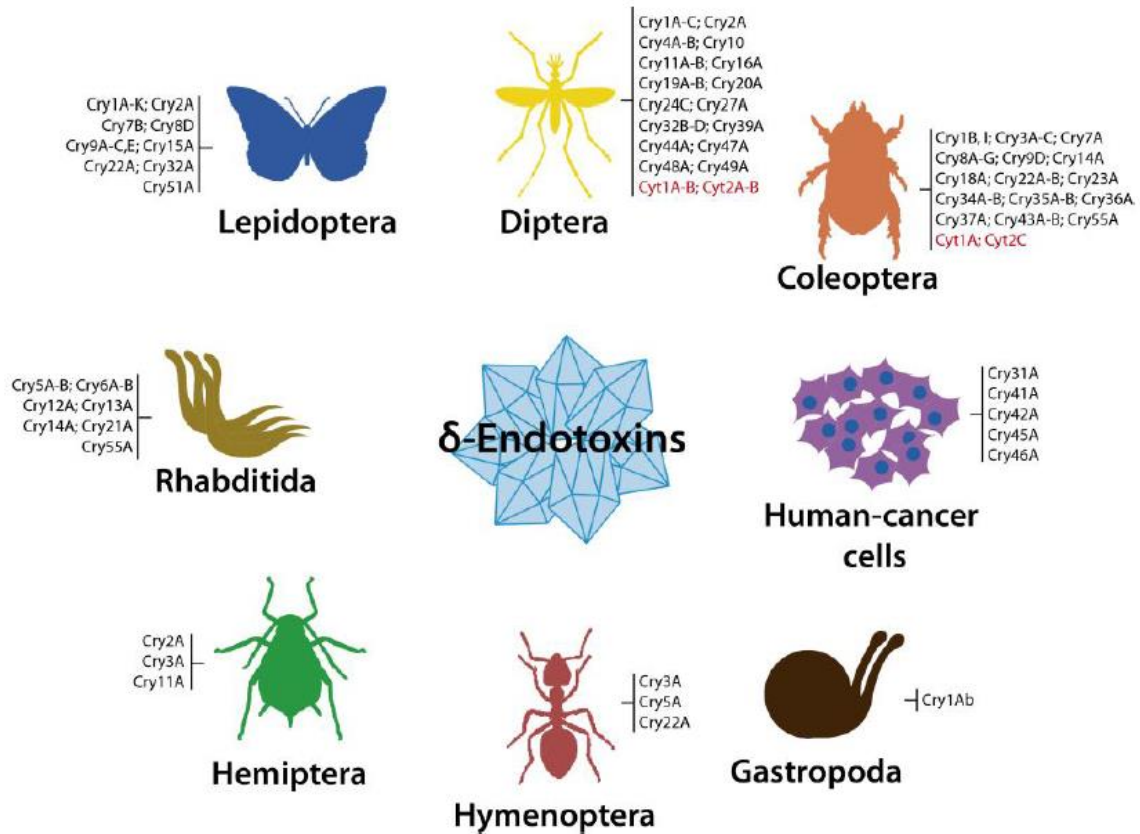
Bt apresenta duas fases principais durante seu ciclo de vida: um crescimento vegetativo na qual a bactéria se multiplica por fissão binária, e outra de esporulação que consiste na diferenciação da bactéria em esporo. Os esporos, quando encontrados em um ambiente favorável ao crescimento (meio com nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e temperatura em torno de 28°C e pH em torno de 7,0), podem germinar e iniciar o crescimento vegetativo.

O Bt é um dos principais microorganismos utilizados no controle biológico (WHO, 1999), graças à produção de inclusões proteicas cristalinas denominadas  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt) no momento de sua esporulação (BRAVO *et al.*, 2007). Estas toxinas se acumulam no compartimento da célula-mãe, podendo corresponder a 1/3 do total de proteínas encontradas na célula e são liberadas juntamente com o esporo, após a lise celular (LERECLUS *et al.*, 1989; ARANTES *et al.*, 2002).

Essa bactéria destaca-se dos organismos empregados no controle biológico por apresentar atividade tóxica contra diversas ordens de insetos dentre elas Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera e Hymenoptera (VAN FRANKENHUYZEN, 2009), estando nelas inclusas importantes pragas agrícolas como *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e vetores de doenças de importância mundial pertencente aos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Diptera: Culicidae) (FEITELSON *et al.*, 1992; LERECLUS *et al.*, 1993; ARANDA *et al.*, 1996; MONNERAT & BRAVO, 2000; POLANCZYK & ALVES, 2003; MONNERAT & PRAÇA, 2006). Atinge ainda organismos como nematóides (SCHNEPF *et al.*, 1998) e caramujos (Figura 1) (ALI *et al.*, 2010), porém são inócuas a outros organismos como seres humanos, vertebrados e plantas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986; OMS, 1987; SARAIVA *et al.*, 2007), sendo uma opção segura para o controle de pragas na agricultura e vetores de doenças (ARANDA *et al.*, 1996; MONNERAT & BRAVO, 2000; CRICKMORE *et al.*, 2015; PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2013).

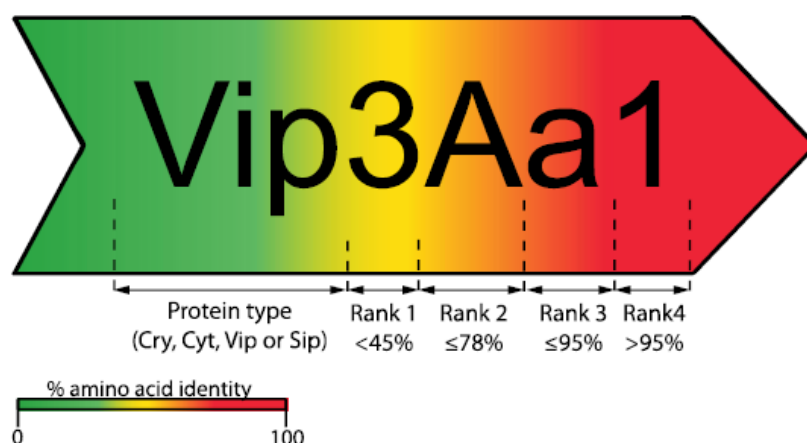
Em 1993 foi estabelecido um Comitê de Nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 1998, 2015). Nesse sistema de nomenclatura, para cada nova toxina é dado um nome baseado na identidade de aminoácidos com as toxinas previamente nomeadas. O agrupamento por esse critério não implica em uma proteína com estrutura similar, com a mesma gama de hospedeiros, nem modo ação. Dessa forma, quatro subcategorias foram formadas: proteínas que compartilham identidade inferior a 45% (atribuído um número arábico), proteínas compartilhando identidade

inferior a 78% (atribuído uma letra maiúscula), proteínas que compartilham identidade inferior a 95% (atribuído uma letra minúscula) e proteínas que compartilham mais de 95% de identidade (número arábico), formando assim o nome da proteína (Figura 2).



**Figura 1.** Visão esquemática mostrando o espectro de ação das  $\delta$ -endotoxinas de Bt. Cry1A-C (separado por hífen) indica um grupo das toxinas Cry1A, Cry1B e Cry1C. Cry1B, I (separado por vírgula) indica diferentes toxinas Cry1B e Cry1I. Ponto e vírgula separam grupos ou toxinas individuais. Toxinas Cyt estão em vermelho (Palma *et al.*, 2014).

Atualmente, as proteínas Cry constituem o maior grupo de proteínas inseticidas produzidas por *Bacillus*. Nas últimas décadas, mais de 700 sequências de genes *cry* que codificam cristais proteicos foram identificadas e a localização desses genes parece ser mais comum em grandes plasmídeos (HÖFTE & WHITELEY, 1989; SCHNEPF *et al.*, 1998; VAN FRANKENHUYZEN *et al.*, 2009, PALMA *et al.*, 2014, CRICKMORE *et al.*, 2015). O Comitê de Nomenclatura de Toxinas de Bt classificou 73 grupos diferentes de proteína Cry, incluindo as proteínas Parasporinas com atividades antitumorígenicas (Cry31, Cry46, Cry41, Cry45, Cry64, Cry63), além de 3 grupos de proteínas Cyt e 4 grupos de proteínas Vip (CRICKMORE *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Visão esquemática do atual Sistema de nomenclatura usado pelo Comitê de Nomenclatura de Toxinas de Bt para  $\delta$ -endotoxinas e toxinas secretáveis. Neste exemplo, os números indicam diferentes proteínas Vip, mudando a subcategoria 1 (Rank 1) de acordo com a porcentagem de similaridade de aminoácidos. A mesma regra se aplica para as subcategorias 2, 3 e 4 (Palma *et al.*, 2014).

Em 1901 ocorreu a primeira descoberta de doenças em insetos causadas por *Bacillus thuringiensis*, feita pelo biólogo japonês Shigetane Ishiwata. Ele descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade de populações do bicho-da-seda, *Bombyx mori* sendo denominada “sotto disease”. O pesquisador chamou essa nova bactéria de *Bacillus sotto*. Ernst Berliner descreveu a mesma bactéria isolando-a de lagartas da traça da farinha, *Anagasta kuhniella*, na região alemã da Thuringia em 1911 (POLANCZYK & ALVES, 2003). Chamou-a de *Bacillus thuringiensis* devido ao local aonde as lagartas foram encontradas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986) e reportou a existência de cristais, porém a atividade destes ainda era desconhecida (UCSD, 2014). O nome dado por Ishiwata não foi considerado válido, e o nome mais recente mantido (GLARE & O’CALLAGHAM, 2000).

Na década de 20, fazendeiros começaram a utilizar Bt como uma alternativa para o controle de insetos na agricultura e, em 1938, uma formulação à base dessa bactéria, a Sporeína, foi produzida na França (WEISIER, 1986).

Nos anos 50, aumentaram os estudos e descobertas a respeito da bioquímica, estrutura e modo geral de ação das inclusões cristalinas de origem protéica de Bt. Desde então, diversos países como Alemanha, Rússia e Estados Unidos começaram a produzir inseticidas biológicos à base de Bt (WEISIER, 1986). Na década de 60, foi isolada uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (DULMAGE, 1970) que apresentou

toxicidade de 2 a 200 vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. Até 1976, pesquisadores acreditavam que o Bt estava incluso em um restrito grupo de microorganismos, com um espectro de ação contra poucas espécies de lepidópteros e este era usado exclusivamente no controle de insetos praga na agricultura. Porém, em 1977, descobriu-se uma estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* tóxica para larvas de mosquitos e de borrachudos (Diptera) (KIM, 1993) A partir dessa descoberta, aumentou-se a procura por estirpes que possuíssem novas toxinas ativas contra outros ordens de insetos, sendo realizados inúmeros programas de seleção, visando o isolamento de estirpes tóxicas a outros insetos.

Nos anos 80, a utilização de Bt cresceu ainda mais, principalmente quando começaram a surgir populações de insetos altamente resistentes aos inseticidas sintéticos. Além disso, os estudos de cientistas e ambientalistas começaram a relatar os problemas causados pelos produtos químicos aos seres vivos e ao meio ambiente (MONNERAT & BRAVO, 2000).

Com o avanço da biologia molecular, ficou cada vez mais fácil a inserção e expressão, em plantas, de genes que codificam as proteínas entomopatogênicas de Bt. As primeiras plantas transgênicas, expressando toxinas de Bt, foram as de tabaco e tomate e a primeira plantação de milho transgênico foi registrada nos Estados Unidos em 1995 (FISCHHOFF, 1987; JOUANIN *et al.*, 1998). Com o passar dos anos, novas tecnologias foram sendo desenvolvidas e novas estirpes descobertas, demonstrando cada vez mais a importância dessa bactéria e sua utilização no controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças.

Estas proteínas são produzidas sob forma de pró-toxinas, sendo transformadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A proteína ativada se liga então a receptores na superfície apical das células epiteliais colunares, formando poros que desregulam as funções celulares e a homeostasia, levando o inseto à morte (ARONSON *et al.*, 1986; HOFMANN *et al.*, 1988; KNOWLES, 1994; LORENCE *et al.*, 1995; SCHNEPF *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 1998, 2007).

A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry, podendo haver casos em que cinco toxinas são encontradas, como por exemplo, no *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. A massa molecular dessas toxinas pode variar entre 14 e 142 kDa. Dependendo da composição da pró-toxina, o cristal pode ser bipiramidal, cubóide,

rombóide, ovóide, esférico, retangular ou sem forma definida. Essa habilidade de cristalização das pró-toxinas pode diminuir sua suscetibilidade à degradação por proteases do hospedeiro (SCHNEPF *et al.*, 1998).

As estirpes de *B. thuringiensis* são agrupadas taxonomicamente por sorotipos ou subespécies, baseado em propriedades bioquímicas e imunogênicas, na reação de aglutinação de antígenos flagelares das células vegetativas (flagelinas), possibilitando a obtenção de anticorpos (DE BARJAC & FRACHON, 1990). Esta classificação utilizando antígenos-H flagelares divide a espécie de *B. thuringiensis* em 82 subespécies, facilitando a diferenciação entre as várias estirpes. No entanto, possui limitações para linhagens de *B. cereus* que não possuem inclusões paraesporais, e mesmo assim reagem de forma cruzada aos anticorpos de sorotipagem, além de existirem problemas com linhagens autoaglutinantes de Bt (LECADET *et al.*, 1999). Algumas estirpes de *B. cereus* possuem proteínas que reagem com soros específicos para *B. thuringiensis* (DE BARJAC & BONNEFOI, 1973), sugerindo uma possível relação evolutiva entre as duas espécies (LECADET *et al.*, 1999). No antigo Centro Internacional de *Bacillus* entomopatogênicos, no Instituto Pasteur em Paris, cerca de 3% das estirpes depositadas no banco eram linhagens autoglutinantes (BURGES *et al.*, 1982). Após fechamento, no ano 2000, desse centro de referência internacional, responsável pela produção dos anticorpos para sorotipagem de Bt, tornou-se difícil a classificação das subespécies de novos isolados de Bt. Além disso, algumas cepas de *B. thuringiensis* imóveis, como *B. thuringiensis* subespécie *wuhanensis*, não possuem flagelos, e conseqüentemente os antígenos necessários para sua classificação. Esse método, embora defina as subespécies, não tem relação direta com a toxicidade das estirpes e pela dificuldade de sua realização está caindo em desuso.

Uma grande quantidade de estirpes de Bt foi isolada e caracterizada, envolvendo vários grupos de pesquisa, em todo o mundo, em busca de novas toxinas (FEITELSON *et al.*, 1992). Estima-se que haja mais de 50.000 estirpes conhecidas em todo o mundo (MONNERAT *et al.*, 2001).

Além das  $\delta$ -endotoxinas, *B. thuringiensis* pode produzir várias outras toxinas, incluindo proteínas com atividade inseticida como a  $\alpha$ -exotoxina,  $\beta$ -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HANSEN & SALAMITOU, 2000), moléculas bioestimuladoras e biofertilizadoras, como fitohormônios, proteínas solubilizadoras de fosfato e sideróforos (CHERIF *et al.*, 2003; BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001; RADDADI *et al.*, 2007, 2008) além de proteínas

Parasporinas, as quais exibem atividade citotóxica específica contra células tumorais de câncer humano (OHBA *et al.*, 2009, OKUMURA *et al.*, 2015).

## 1.2 Parasporinas

Historicamente, acreditava-se que *B. thuringiensis* havia adquirido atividade inseticida no curso da co-evolução com insetos, através de uma relação hospedeiro-parasita. Contudo, algumas evidências sugerem que Bt, como espécie, é meramente um organismo saprófita e não um patógeno obrigatório de insetos (OHBA *et al.*, 2009). Essa ideia é suportada pelo fato de que *B. thuringiensis* isolados de ambientes naturais com proteínas Cry não inseticidas estão em maior número que isolados com proteínas Cry inseticidas (OHBA *et al.*, 1986; HASTOWO *et al.*, 1992; MAEDA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003). Os isolados não inseticidas, muitas vezes compreendem mais de 90% de populações naturais do solo (OHBA *et al.*, 2000; OHBA *et al.*, 2002; YASUTAKE *et al.*, 2006; YASUTAKE *et al.*, 2007) e filoplano (OHBA *et al.*, 1996; MISUKI *et al.*, 1999). Assim, a questão importante que surge naturalmente é se as proteínas Cry sintetizadas por estirpes não entomopatogênicas possuem qualquer atividade biológica que ainda é desconhecida.

Com base nesse contexto histórico, Mizuki e colaboradores em 1999 iniciaram uma varredura em larga escala de estirpes de Bt, no qual 1744 estirpes foram investigadas quanto à atividade citotóxica contra células T leucêmicas humanas e atividade hemolítica em eritrócitos de ovelha. Isso levou à descoberta de estirpes de Bt produtoras de proteínas capazes de discriminar células T normais de células T leucêmicas, matando preferencialmente a linhagem tumorigênica (MIZUKI *et al.*, 1999). Uma proteína Cry com atividade anticancerosa foi obtida da estirpe A1190 (MIZUKI *et al.*, 2000), o que acabou levando à criação de uma nova categoria de proteínas, as Parasporinas (PSs), definidas como proteínas não hemolíticas, tóxicas preferencialmente para células cancerosas (MIZUKI *et al.*, 1999; MIZUKI *et al.*, 2000). A partir desses achados, essas proteínas se tornaram alvo de constantes pesquisas devido ao seu potencial para tratamento do câncer. Estudos subsequentes levaram à descoberta de várias outras proteínas pertencentes ao grupo das Parasporinas.

Até o momento, seis classes de Parasporinas foram identificadas (Tabela 1), com base na homologia das suas sequências de aminoácidos e classificadas pelo Comitê de Classificação e Nomenclatura de Parasporina (<http://parasporin.fitc.pref->



fukuoka.jp/index.html), totalizando 19 diferentes PSs identificadas a partir de 17 diferentes estirpes de Bt. Destas, 11 pertencentes ao grupo PS1, 3 ao grupo PS2, 2 ao PS3, e os grupos PS4, PS5 e PS6 possuem apenas 1 representante cada. As Parasporinas apresentam modo de ação diferente entre as famílias, assim como diferente espectro citotóxico e nível de atividade (OHBA *et al.*, 2009). Para sua ativação, assim como as proteínas inseticidas, é de importância crucial a ativação das pró-toxinas em toxinas com o auxílio de proteases.

**Tabela 1.** Características das parasporinas (Adaptado de OHBA *et al.*, 2009).

Parasporina <sup>a</sup>	Estirpe de origem de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Precursor (kDa)	Forma ativa <sup>b</sup> (kDa)	Ativação
PS1Aa1 (Cry31Aa1)	A1190	81	15+56 <sup>c</sup>	Proteína Cry com três domínios, ativadas por digestão na porção N-terminal
PS2Aa1 (Cry46Aa1)	A1547	37	30	Proteína Cry sem três domínios, ativadas por digestão na porção N- e C-terminal
PS3Aa1 (Cry41Aa1)	A1462	88	64	Proteína Cry com três domínios, ativadas por digestão na porção N- e C-terminal
PS4Aa1 (Cry45Aa1)	A1470	34	27	Proteína Cry com três domínios, ativadas por digestão na porção C-terminal
PS5Aa1 (Cry64Aa1)	A1100	34	30	Proteína Cry sem três domínios, ativadas por digestão na porção C-terminal
PS6Aa1 (Cry63Aa1)	M019	84	14+59	Proteína Cry com três domínios, ativadas por digestão na porção N-terminal

<sup>a</sup>PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 e PS6 correspondem à Cry31, Cry46, Cry41, Cry45, Cry64 e Cry63, respectivamente. <sup>b</sup>Gerado por digestão com protease. <sup>c</sup>Heterodímero.

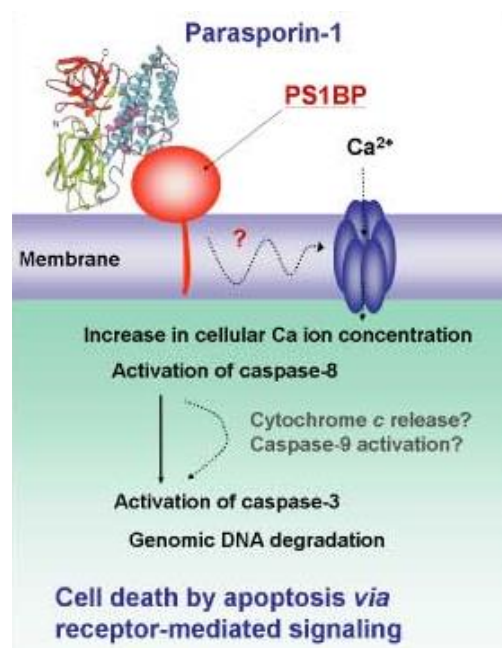
### 1.2.1 Parasporina 1 (Cry31)

A Parasporina 1 (PS1Aa1) produzida pelo Bt A1190 é uma proteína de 723 aminoácidos e massa molecular de 81 kDa (pró-tóxina), codificada por um gene de 2.169 pb. Esta proteína tem uma estrutura de três domínios, onde a sequência de aminoácidos possui 5 blocos conservados comumente achados em proteínas Cry inseticidas. Contudo, uma pequena homologia (< 25%) existe entre a PS1 e as classes de proteínas Cry e Cyt (OHBA *et al.*, 2009).

A pró-toxina, após ativação com tripsina, produz dois fragmentos de 15 kDa e 56 kDa. Esses dois fragmentos estão intimamente relacionados, agindo conjuntamente na citotoxicidade contra células tumorais. Análises estruturais mostraram que esses fragmentos formam um heterodímero na proporção de 1:1, apresentando alta toxicidade e especificidade contra células de câncer de colo do útero (HeLa) e células T leucêmicas (MOLT-4) (KATAYAMA *et al.*, 2005).

Essa proteína, ao contrário das já conhecidas proteínas Cry inseticidas, não é uma toxina formadora de poros. Pode-se observar que a toxina ativada não afeta a permeabilidade da membrana celular, e seu efeito citotóxico se apresenta tardiamente, após 8-10 horas da administração da toxina. Esses resultados, juntamente com o fato dessa proteína não estar relacionada genealogicamente e estruturalmente com as outras Parasporinas, sugerem que o tipo de morte celular envolvido com essa proteína não seja a formação de poros na membrana (OHBA *et al.*, 2009). Katayama e colaboradores (2007) demonstraram que a PS1Aa1 ativada causa um influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para o interior celular. Esse influxo não está relacionado com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  nem com  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mas sim com  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Esse influxo de cálcio leva a ativação de proteínas relacionadas com a morte celular, como a caspase-3 e a poli(ADP-ribose)polimerase. Além disso, proteínas G heterotriméricas ou receptores acoplados à proteína G estão relacionados com esse mecanismo de ação, induzindo a célula à morte por apoptose (Figura 3).



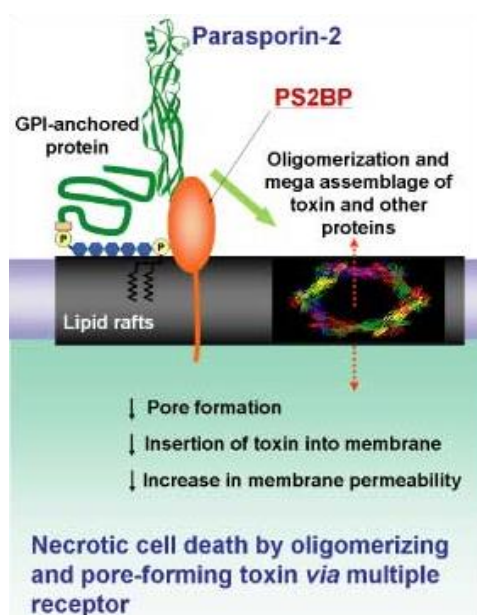
**Figura 3.** Modo de ação da proteína Parasporina 1. Após ligação da proteína ativa ao receptor de membrana, ocorre influxo de cálcio para o citoplasma celular, ocorrendo ativação da via das caspases e indução da apoptose. (Akiba *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Parasporina 2 (Cry46)

A toxina Parasporina 2 (PS2Aa1) proveniente da estirpe de Bt A1547 (sorotipo *dakota*), diferentemente da PS1, não possui três domínios, e conseqüentemente lhe falta

os blocos conservados presentes nas proteínas Cry inseticidas. Porém, apresenta uma identidade (<25%) com a proteína Cry15Aa, pertencente as toxinas tipo MTX de *Lysinibacillus sphaericus* (ITO *et al.*, 2004; AKIBA *et al.*, 2009). É uma proteína com 338 resíduos de aminoácidos e traduzida a partir de um gene de 1.014 pb.

Apresenta toxicidade contra células T leucêmicas (MOLT-4 e Jurkat), câncer de útero (Sawano) e câncer hepático (HepG2). Utilizando cortes histológicos de biópsias de câncer do colo do útero e câncer de fígado, PS2 preferencialmente matou as células de câncer, deixando as células normais do pedaço de tecido intactas (ITO *et al.*, 2004). As sequências de aminoácidos dessas proteínas sugerem uma homologia com toxinas aerolisinas formadoras de poro do tipo  $\beta$  ( $\beta$ -PFTs). A pró-toxina (37 kDa), após processamento proteolítico com Proteinase K, gera a toxina ativa (30 kDa), a qual irá formar oligômeros (>200 kDa) em regiões da membrana ricas em colesterol, as jangadas lipídicas, levando à formação de poros e conseqüentemente à lise celular, não ocorrendo assim apoptose (Figura 4). Proteínas ancoradas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) estão envolvidas nessa atividade citotóxica, possivelmente como receptor dessa proteína (ITO *et al.*, 2004; KITADA *et al.*, 2006, 2009; AKIBA *et al.*, 2009). Existe grande homologia entre as sequências de aminoácidos de PS2Aa1 e a toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, bem como em seus mecanismos de ação envolvidos na morte celular (OHBA *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Modo de ação da proteína Parasporina 2. Após ligação da proteína ativa ao receptor de membrana, ocorre oligomerização das proteínas na membrana celular e conseqüente formação de poros, levando a célula à perda da homeostase e desequilíbrio osmótico, ocorrendo necrose celular (Akiba *et al.*, 2009).

### 1.2.3 Parasporina 3 (Cry41)

Parasporina 3 (PS3Aa1 e PS3Ab1) são proteínas de 88 kDa provenientes da estirpe de Bt A1462. Essa proteína possui 825 resíduos de aminoácidos que forma uma pró-toxina de 88 kDa, que após tratamento com Proteinase K gera uma toxina ativa de 64 kDa. Apresenta toxicidade e especificidade contra células de câncer de fígado (HepG2) e células T leucêmicas (HL-60) (YAMASHITA *et al.*, 2005). Apesar de ter uma baixa similaridade com as proteínas Cry e Cyt, possui estrutura de três domínios, onde a sequência de aminoácidos possui 5 blocos conservados comumente observados em proteínas Cry inseticidas. Baseado nisso, PS3 provavelmente segue o modelo similar de ligação a receptores específicos e formação de poros na membrana celular. Essa idéia tem como suporte o fato de PS3Aa1 aumentar a permeabilidade de membrana das células alvo (YAMASHITA *et al.*, 2005).

### 1.2.4 Parasporina 4 (Cry45)

Parasporina 4 é produzida pela estirpe de Bt A1470, pertencente ao sorotipo *shandongiensis*. Possui 274 aminoácidos, formando uma pró-toxina de 34 kDa, codificada por um gene de 828 pb, possuindo três domínios. Após ativação com Proteinase K, produz uma toxina de 27 kDa tóxica contra células T leucêmicas (MOLT-4 e HL-60), células de câncer de cólon (CACO-2) e células de câncer do colo do útero (Sawano e TCS) (OHBA *et al.*, 2009).

Assim como PS2, a Parasporina 4 possui homologia com aerolisinas formadoras de poro do tipo  $\beta$ , possuindo um mecanismo de ação muito semelhante à PS2. PS4 liga-se inespecificamente à membrana plasmática das células-alvo, formando oligômeros e induzindo a célula à morte. Diferente de outras  $\beta$ -PFTs, PS4 é uma proteína formadora de poro independente de colesterol. O receptor específico e a composição de oligômeros de PS4 permanecem desconhecidos (OKUMURA *et al.*, 2008, 2011).

### 1.2.5 Parasporina 5 e 6 (Cry64 e Cry 63)

A literatura a respeito das Parasporinas 5 e 6 ainda é muito escassa. A PS5 oriunda da estirpe A1100 possui uma pró-toxina de 34 kDa, ativada com Proteinase K, dando origem a uma toxina ativa de 30 kDa. Assim como PS2 e PS4, possui homologia

com aerolisinas formadoras de poro do tipo  $\beta$ . Seu mecanismo de ação é ainda desconhecido, mas baseado em sua homologia com aerolisinas, possivelmente forma poros nas membranas das células alvo (EKINO *et al.*, 2014).

PS6 compartilha uma estrutura muito parecida com as PS1 e PS3, possuindo estrutura de três domínios, onde a sequência de aminoácidos possui 5 blocos conservados comumente achados em proteínas Cry inseticidas. Seu precursor é uma pró-toxina de 84 kDa, que após ativação com tripsina produz uma proteína madura de 73 kDa formada por um heterodímero de 59 kDa e 14 kDa. Possui citotoxicidade contra as linhagens de câncer de fígado (HepG2) e câncer do cólo do útero (HeLa) (NAGAMATSU *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação dessa proteína em células de câncer humano ainda não é esclarecido. Especula-se que PS6 possa ser uma proteína formadora de poro (NAGAMATSU *et al.*, 2010).

### **1.2.6 Estrutura Tridimensional das Parasporinas 2 e 4**

A estrutura tridimensional da Parasporina 2 e da proteína não tóxica de 26 kDa, produzida pela mesma estirpe de Bt A1470, que compartilha 38% de identidade com a sequência da Parasporina 4, foram recentemente determinadas. Através do programa SWISS-MODEL, Akiba e colaboradores (2009) utilizaram a proteína não tóxica de 26 kDa como modelo para produção de uma estrutura tridimensional da Parasporina 4 (AKIBA *et al.*, 2004, 2006, 2009; GUEX *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2014).

Toxinas tipo aerolisinas, como as PS2 e PS4, possuem uma notável identidade em suas sequências ou uma semelhança estrutural entre seus domínios (Figura 5), atuando também como citolisinas através da formação de poros (KNAPP *et al.*, 2010).

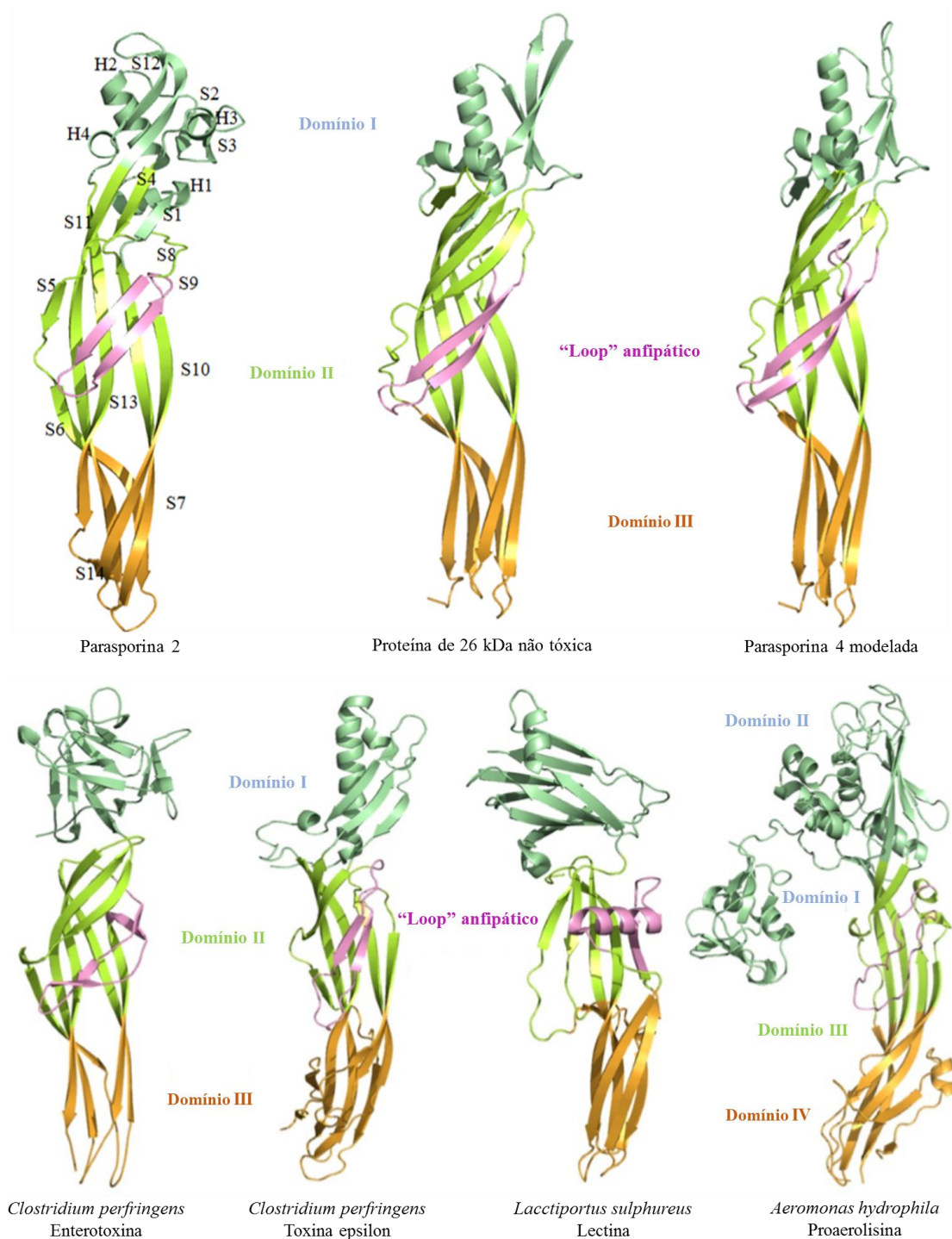
O Domínio I dessas proteínas desempenha um importante papel na interação da proteína com as âncoras de GPI (COLE *et al.*, 2004). As  $\alpha$ -hélices só existem nesse domínio. Na porção N-terminal há a formação de uma curta volta- $\beta$  e na porção C-terminal está inclusa uma parte do maior domínio  $\beta$ . No domínio I de proteínas formadoras de poro do tipo  $\beta$  ( $\beta$ -PFT), resíduos aromáticos são abundantes. Esses resíduos aromáticos podem ligar-se a carboidratos, como galactose e glicose, formando interações proteína-carboidrato. Essa interação é determinada pela posição e orientação relativa, a qual pode contribuir para as diferentes especificidades de ligações das

proteínas ligantes de açúcar (PAYNE *et al.*, 2011). Por comparação estrutural, tanto o domínio I do modelo de PS2 quanto o de PS4 podem ter cadeias  $\beta$  curtas.

No domínio II da PS2, uma cadeia formada por quatro folhas- $\beta$  nas proximidades do domínio I se associa com as hélices do domínio I através de interações hidrofóbicas. A superfície interna das folhas- $\beta$  e uma volta- $\beta$  anfipática formam um núcleo hidrofóbico rodeado por resíduos hidrofílicos nas folhas- $\beta$ , sendo estabilizado pelas pontes de hidrogênio (AKIBA *et al.*, 2006, 2009). A disposição dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos têm um papel importante no dobramento da proteína (SCHWARTZ *et al.*, 2001). Nos modelos estruturais baseados em toxinas da família das aerolisinas, a volta- $\beta$  anfipática poderia transpor a membrana, o que é necessário para a formação de poro (MELTON *et al.*, 2004). Além disso, mutagênese dirigida nos domínios  $\beta$  anfipáticos de proteínas tipo aerolisinas pode alterar características do canal na bicamada lipídica. Isso sugere que o domínio II pode estar envolvido no processo de inserção na membrana e formação de poro (KNAPP *et al.*, 2009). Cadeias adjacentes à volta- $\beta$  anfipática em PS2 (cadeia S4 e S5) e no modelo para parasporina 4 são separadas por alças, podendo ser deduzido que as cadeias  $\beta$  separadas podem ser mais flexíveis para facilitar o desdobramento da volta- $\beta$  anfipática durante o processo de transmembrana.

Além disso, PS2 tem uma notável distribuição de resíduos serina e treonina hidrofóbicos nas cadeias  $\beta$  adjacentes à volta- $\beta$  anfipática no domínio II (AKIBA *et al.*, 2009). Sequências flanqueadoras similares ricas em serina e treonina também são encontradas em outras estruturas conhecidas de proteínas  $\beta$ -PFT, como ETX, aerolisina,  $\alpha$ -toxina e MTXs (COLE *et al.*, 2004), reforçando a idéia de que essas sequências participam no processo de transmembrana (COLE *et al.*, 2004; AKIBA *et al.*, 2009).

No domínio III da PS2 há uma cadeia tripla de folhas- $\beta$  antiparalelas e uma cadeia dupla de folhas- $\beta$  antiparalelas, que interagem formando um sanduíche- $\beta$  (AKIBA *et al.*, 2006, 2009). Como a região C-terminal da PS2 pode ser removida durante a ativação por digestão proteolítica, uma parte do núcleo hidrofóbico localizado dentro do sanduíche- $\beta$  é exposto ao solvente, formando um pequeno trecho hidrofóbico na superfície ao longo da cadeia  $\beta$ . Esse domínio possivelmente está relacionado com a oligomerização da toxina na membrana das células-alvo, participando na formação do poro (COLE *et al.*, 2004, XU *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Comparação estrutural entre Parasporina 2, a proteína não tóxica de 26 kDa e proteínas formadoras de poro do tipo  $\beta$ . A porção N-terminal de ligação com a membrana está representada na cor verde escuro. Regiões de inserção na membrana e formação do poro estão representados na cor verde claro e alaranjado, respectivamente. A região colorida de rosa representa a volta- $\beta$  anfipática, a qual possivelmente é responsável pela formação do poro. Parasporina 4 foi desenhada utilizando a proteína não tóxica de 26 kDa como modelo (Adaptado de XU *et al.*, 2014).

### 1.3 Câncer

Câncer é o nome conferido a um grupo formado por mais de cem doenças caracterizadas pela interrupção dos mecanismos que regulam o crescimento e a divisão celular e pela habilidade das células cancerosas de invadirem outros tecidos, representando uma ameaça à saúde global com consequências econômicas consideráveis (MARIOTTO *et al.*, 2011, AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). O câncer está relacionado como o principal causador de morte em países economicamente desenvolvidos e como a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento (JEMAL *et al.*, 2011). A incidência do câncer em países economicamente desenvolvidos vem aumentando como consequência do envelhecimento e do crescimento da população, assim como pela falta de exercício físico, pelo tabagismo e pelas dietas à base de produtos industrializados (JEMAL *et al.*, 2011).

Somente no ano de 2012, essa doença foi responsável por 8,2 milhões de óbitos. Estima-se que em 2030 haja 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas portadoras de algum tipo de neoplasia maligna (GLOBOCAN, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; WHO, 2014).

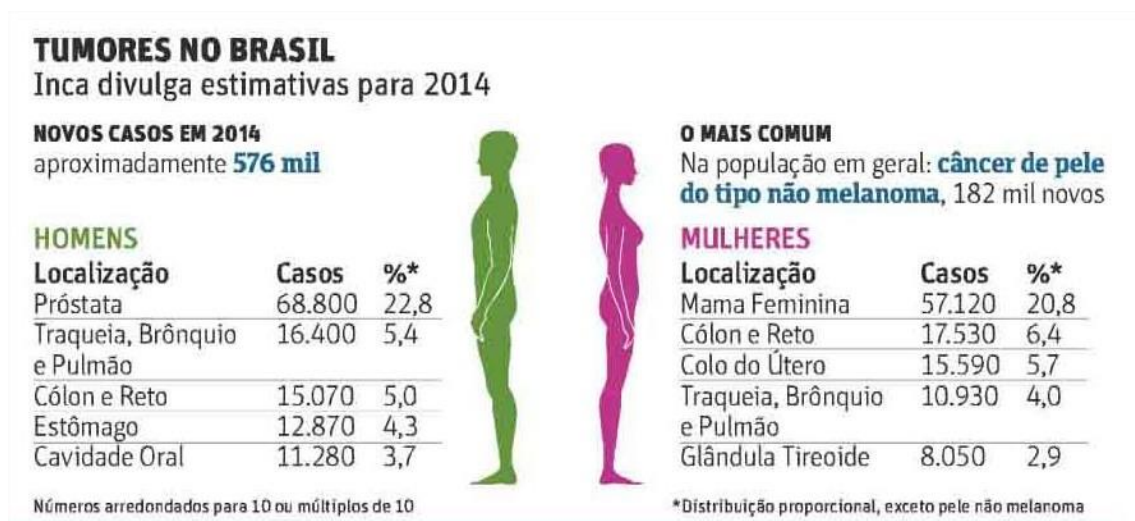
No Brasil, desde a década de 60, as doenças infecciosas deixaram de ser a maior causa de morte e cederam lugar às doenças do sistema circulatório e às neoplasias (INCA, 2011). Esse processo, conhecido como transição epidemiológica, deve-se principalmente ao envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde (INCA, 2014).

São estimados 576 mil novos casos de câncer no Brasil em 2014. Exceto os casos de câncer de pele não melanoma, 48% desses novos casos ocorrerão em mulheres, sendo o câncer de mama o mais frequente (20,8%) e 52% em homens, sendo o câncer de próstata o mais frequente (22,8%) (Figura 6) (INCA, 2014). A taxa de incidência global de câncer é quase 25% maior em homens do que em mulheres (GLOBOCAN, 2012).

O tumor surge como resultado de vários eventos, podendo ser fatores internos como mutações herdadas, disfunção hormonal, condições imunológicas e mutações geradas em decorrência do metabolismo ou fatores externos como agentes infecciosos, agentes químicos e radiação ionizante (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Estes



fatores causais podem agir juntos ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese.



**Figura 6.** Estimativa de casos de tumores no Brasil para o ano de 2014 (INCA, 2014).

O processo de expansão clonal que leva à formação do tumor após mudanças no genoma, por muitos anos foi relacionado apenas com mutações, porém hoje pode ser explicado também por mudanças epigenéticas (DAWSON & KOUZARIDES, 2012). Mecanismos como metilação do DNA e modificações nas caudas de histona promovem mudanças herdáveis em genes relacionados com a supressão tumoral, por exemplo, levando a expansões clonais malignas (ESTELLER, 2007; JONES & BAYLIN, 2007; BERDASCO & ESTELLER, 2010). A hipometilação nas células cancerígenas em comparação com as células normais foram as primeiras evidências encontradas do envolvimento da epigenética no estado tumoral (FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983; GOELZ *et al.*, 1985)

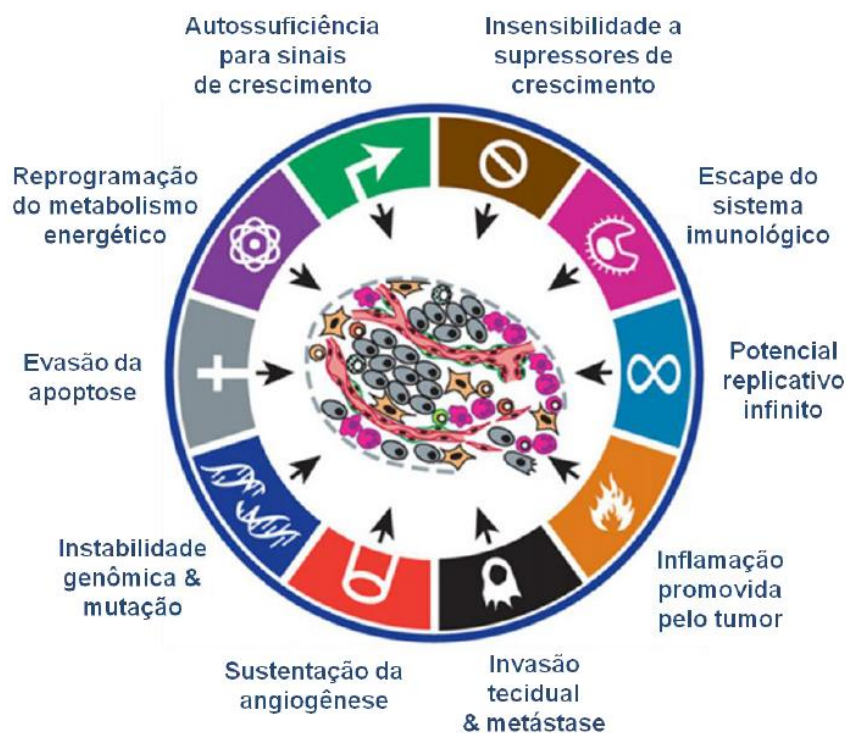
O diagnóstico precoce é fundamental para o sucesso do tratamento, no entanto estima-se que mais de dez anos se passam entre a exposição a fatores externos e a detecção do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Com os avanços nas pesquisas sobre o câncer nos anos 1980 e 1990 (MOOLGAVKAR & KNUDSON, 1981; WEINBERG, 1989; HARRIS, 1991; LOEB, 1991; HIROHASHI, 1998; ZINGG & JONES, 1997; MINAMOTO *et al.*, 1999; REED, 1999), vários dados sobre o comportamento celular no processo da tumorigênese foram obtidos, porém de forma densa e complexa. Hanahan e Weinberg publicaram no ano 2000 os “*hallmarks*” do câncer, onde foram enumeradas seis características que eram

adquiridas pelas células durante o processo de formação do tumor, com o objetivo de facilitar o acesso ao conhecimento adquirido nas décadas passadas e o entendimento sobre as modificações celulares observadas no câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

A primeira característica é a manutenção da sinalização proliferativa. As células cancerígenas continuam a se dividir em situações nas quais células normais aguardariam em repouso por uma sinalização química. A segunda é o crescimento, apesar dos supressores de crescimento emitirem sinais de parada pelas células adjacentes que estão sendo comprimidas pela expansão do tumor. A terceira é a evasão de mecanismos de morte celular programada. Em células saudáveis, um dano genético em um nível crítico, geralmente ativa os mecanismos apoptóticos, todavia, as células tumorais ignoram esses comandos. A quarta é a habilidade para estimular a angiogênese, estimulado por sua necessidade de oxigênio e nutrientes, levando a formação de novos vasos sanguíneos. A quinta característica é o potencial replicativo infinito. Uma cultura de células humanas normais para de se dividir após 50 a 70 gerações, enquanto as células malignas agem manipulando seus telômeros, forçando o limite reprodutivo. A sexta propriedade é a habilidade de invadir um tecido próximo e produzir metástase, se espalhando por outros órgãos, o que dá aos tumores malignos seu caráter letal (HAHN & WEINBERG, 2002).

Estudos realizados na última década permitiram que Hanahan e Weinberg, em 2011, adicionassem duas novas características na lista anteriormente proposta, a reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imunológico. Além disso, também sugeriram duas outras características intrínsecas da neoplasia que facilitam a aquisição de todos os 8 “*hallmarks*” sugeridos. A mais proeminente delas é o desenvolvimento de instabilidade genômica, a qual gera mutações aleatórias incluindo rearranjos cromossômicos; entre estas estão as mudanças genéticas raras que podem orquestrar a aquisição desses traços tumorais. A segunda característica habilitada nestas células envolve o estado inflamatório das lesões pré-malignas e fracamente malignas que é dirigido pelas células do sistema imune, algumas das quais servem para promover a progressão tumoral. (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Todas essas dez características apresentadas pelas células tumorais podem ser observadas na Figura 7.



**Figura 7.** As dez capacidades adquiridas do câncer propostas por Hanahan e Weinberg (Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).

### 1.3.1 Câncer de Mama

Em todo o mundo, o câncer de mama (CM) é o tipo de neoplasia maligna que mais acomete as mulheres. O principal fator de risco para o CM é o envelhecimento, porém há outros fatores de risco bem estabelecidos, como os relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, primeira gestação após os 30 anos de idade, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e reposição hormonal) e ao histórico familiar de câncer de mama, em que frequentemente são observadas alterações em genes relacionados à regulação, ao metabolismo hormonal e ao reparo de DNA (BRASIL, 2011, 2014; STUCKEY, 2011; ABDULKAREEM & ZURMI, 2012).

O CM pode ser diferenciado, segundo classificações terapêuticas, em três grupos principais: ER+, que expressa o receptor de estrogênio (VAN'T VEER *et al.*, 2002); HER2 aumentado, que possui elevada expressão do receptor do fator de crescimento epidermal humano (SLAMON *et al.*, 1987); e triplo negativos, que não expressa o receptor de estrogênio (ER), progesterona (PR) e nem HER2 (PEROU, 2011). Cada tipo de tumor de mama apresenta características biológicas únicas e interage com células

endoteliais por meio de fatores secretados e diretamente pelo contato célula-a-célula (FOLKMAN, 2006). Essas variações nas características moleculares de um mesmo tipo de câncer mostraram a importância de se tomar medidas preventivas ou definir tratamentos levando em consideração as características individuais (WACHOLDER *et al.*, 2010).

O câncer de mama é o tipo de neoplasia responsável pela maior mortalidade na população feminina brasileira, apesar de apresentar bom prognóstico quando diagnosticado em fase inicial. A elevada taxa de mortalidade é causada, principalmente, pelo diagnóstico tardio da doença, a falta de acesso aos instrumentos de diagnóstico e devido à falta de políticas de prevenção (TONANI & CARVALHO, 2008; LEE *et al.*, 2012, BRASIL, 2014, WHO, 2015).

A sobrevida associada aos pacientes com CM nas últimas quatro décadas vem aumentando nos países desenvolvidos, sendo atualmente de 85% em cinco anos, enquanto que nos países em desenvolvimento, esta taxa permanece com valores entre 50% e 60% (INCA, 2014).

O tratamento do câncer de mama baseia-se principalmente na cirurgia, na quimioterapia, na radioterapia e na terapia hormonal. A cirurgia é uma das principais modalidades para tratamento e controle do câncer (PURUSHOTHAM *et al.*, 2012, RUITERKAMP & ERNST, 2011). Os procedimentos cirúrgicos, ainda que eficazes em inúmeros casos diagnosticados na fase inicial, muitas vezes falham por não ser possível fazer a retirada total ou mesmo parcial do tumor, além de apresentarem riscos de seqüelas físicas e emocionais pós-operatórias.

A realização de radioterapia após a cirurgia diminui a recorrência local do tumor, uma vez que elimina as células tumorais microscópicas remanescentes. Embora as células neoplásicas sejam mais susceptíveis ao tratamento radioterápico, as células normais adjacentes ao tecido tumoral também são danificadas, levando a diversos efeitos colaterais, como fibroses, danos vasculares, cardíacos e pulmonares (MALAS ORUÇ *et al.*, 2004; PIERCE, 2005; NILSSON *et al.*, 2011) posteriores ao tratamento radioterápico, além do desenvolvimento de cânceres induzidos pela radioterapia (MAUGHAN *et al.*, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2011).

A quimioterapia é um dos tratamentos sistêmicos mais utilizados no combate ao câncer e tem sido crescente o seu uso em combinação com duas ou mais drogas. Dentre as drogas mais utilizadas no tratamento do câncer de mama metastático, encontram-se os taxanos (Paclitaxel) e as antraciclinas (Adriamicina e Doxorrubicina). Entretanto,

assim como a radioterapia, a quimioterapia é inespecífica, causando danos não só às células tumorais, mas também às células normais (FENG & CHIEN, 2003).

Já a terapia hormonal envolve o uso de inibidores enzimáticos, como os inibidores da aromatase, que bloqueiam a conversão de hormônios androgênicos em estrógeno, e de moduladores de receptores hormonais, como o tamoxifeno, que é utilizado para modular o efeito do estrógeno (LI *et al.*, 2009; PUHALLA *et al.*, 2012). Contudo, a terapia hormonal só é efetiva contra tumores que apresentam receptores hormonais. Além disso, assim como as outras terapias, apresenta efeitos colaterais, como o risco aumentado de câncer de endométrio em mulheres acima de 50 anos e às ocorrências de trombose venosa profunda e de embolia pulmonar (TANAKA *et al.*, 2009; ABDULKAREEM & ZURMI, 2012).

Já a terapia com produtos biotecnológicos tem sido muito utilizada. O trastuzumab (Herceptin®), um anticorpo monoclonal que se liga seletivamente ao HER-2, que é superexpresso em 20 a 30% dos tumores de mama nos Estágios I e II e que está relacionada a um pior prognóstico. O tratamento com trastuzumab é combinado com a terapia hormonal e com o uso de quimioterápicos, sendo capaz de aumentar a sobrevivência dos pacientes. Entretanto, esta combinação está relacionada ao aparecimento de toxicidade cardíaca (MAUGHAN *et al.*, 2010; HARBECK, 2011; PEGRAM & LIAO, 2012).

As diversas desvantagens apresentadas pelas terapias convencionalmente empregadas no tratamento do câncer têm estimulado a busca por novos alvos terapêuticos nos vários subtipos moleculares de câncer de mama, visando a melhoria nos diagnósticos e a utilização de terapias cada vez mais individualizadas, para que dessa forma seja possível alterar o resultado final da doença (EISENBERG & KOIFMAN, 2001; VIEIRA *et al.*, 2008; TONANI & CARVALHO, 2008; TRUFELLI *et al.*, 2008,).

### **1.3.2 Câncer de Próstata**

O câncer de próstata (CP) é a segunda neoplasia mais frequente em homens no mundo (GLOBOCAN, 2012) e também no Brasil (INCA, 2014). Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que no ano de 2012 surgiram 1,1 milhões de novos casos de câncer de próstata, o que representa 15% da incidência total de cânceres em homens (GLOBOCAN, 2012). A taxa de

incidência do CP no mundo é cerca de 2 a 5 vezes maior em países desenvolvidos (JEMAL *et al.*, 2011), o que representa cerca de 70% dos casos deste tipo de câncer (GLOBOCAN, 2012). Estas taxas são resultantes de uma grande variação de fatores de risco e práticas de diagnósticos aplicadas nesses países (JEMAL *et al.*, 2011).

Desde a década de 60, observa-se um aumento progressivo na incidência de CP (GOMES *et al.*, 2008) e atualmente essa taxa varia em cerca de 25 vezes entre os países do mundo, devido a ampla utilização do teste do antígeno prostático específico (PSA) e pela utilização de biópsia. Em contraste, a taxa de mortalidade no mundo varia cerca de 10 vezes (FERLAY *et al.*, 2010). Estima-se 307 mil óbitos devido ao CP no ano de 2012, representando 6,6% dos casos de morte por câncer em homens (GLOBOCAN, 2012).

Para o ano de 2014, foi estimado o surgimento de 68.800 novos casos de câncer de próstata somente no Brasil (INCA, 2014). Esse número representa um aumento de 6.000 novos casos em comparação ao previsto para o ano de 2012 (INCA, 2011). As regiões de maior frequência de novas incidências do câncer de próstata no país são Sudeste, Sul e Centro-Oeste com cerca de 35.980, 12.830 e 4.580 novos casos, respectivamente (INCA, 2014).

Os fatores de risco mais consolidados para o desenvolvimento do câncer de próstata são a idade avançada, o histórico familiar, raça negra, dieta, estilo de vida e os níveis de andrógeno (NELSON *et al.*, 2003; Hoffman, 2011; RICKE *et al.*, 2012; SFANOS e DE MARZO, 2012). Como componentes hereditários e ambientais estão fortemente envolvidos na formação do câncer de próstata, em países como os Estados Unidos, onde é adotada uma dieta rica em carnes e gordura animal, com pouca ingestão de verduras e frutas (DE MARZO, 2007) encontra-se um dos maiores índices de incidência e mortalidade para este tipo de câncer (GLOBOCAN, 2012).

O diagnóstico envolve várias etapas: o rastreamento por meio da dosagem de PSA no sangue, o exame retal e a biópsia da glândula, esta última é considerada o exame diagnóstico definitivo (OTTLEY & GOLD, 2012).

Nesse sentido, é importante que o rastreamento do CP seja realizado por meio de avaliações anuais iniciadas a partir dos 50 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2011). Para pacientes que possuem fatores de risco são recomendadas avaliações iniciadas aos 40 anos (BANTIS & GRAMMATICOS, 2012; CAMPOS *et al.*, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2011; SROUGI *et al.*, 2008).

A maioria dos CPs é classificada como adenocarcinomas. Esses tipos de tumores caracterizam-se histologicamente pela ausência de células basais e pela proliferação descontrolada de células tumorais com características de células luminais, incluindo a formação glandular e a expressão de andrógenos e de antígeno prostático específico (PSA) (CHEN, *et al.*, 2012).

O CP possui prognóstico variável. Em alguns homens manifesta-se com alto grau de agressividade e letalidade, enquanto em outros não apresenta manifestações clínicas (BRITO & MORAIS, 2012; SANTOS *et al.*, 2010; SROUGI *et al.*, 2008). Na maioria dos casos o câncer apresenta-se restrito à próstata, sendo necessário até quinze anos para que o tumor alcance 1cm<sup>3</sup>, correspondendo a aproximadamente 80% dos casos. Em 20% dos casos ocorre a forma letal, metastática e agressiva. A prostatectomia (remoção cirúrgica da próstata e alguns linfonodos próximos à região) e a radioterapia são os tratamentos mais utilizados nos estágios iniciais da neoplasia. Para os estágios avançados do câncer de próstata, é indicada a terapia local definitiva combinada com radioterapia e/ou terapia hormonal de privação androgênica, porém sua eficácia é limitada (HOFFMAN, 2011; OTTLEY & GOLD, 2012; WILT & AHMED, 2013).

Embora inicialmente todos os pacientes respondam à terapia de privação de andrógenos, uma taxa elevada desses pacientes apresentam recidiva com crescimento tumoral resistente à terapia (DUTT & GAO, 2009). Em alguns casos, o crescimento tumoral independente de andrógeno desencadeia um processo inflamatório com recrutamento de células do sistema imune (AMMIRANTE *et al.*, 2010). Apesar desta resposta indesejada, a privação de andrógenos permanece como a terapia mais eficaz contra o câncer de próstata avançado, levando à morte das células cancerosas e à queda de 90% dos níveis de PSA endógeno do paciente (HARRIS *et al.*, 2009).

Quando o tumor não responde à terapia hormonal inicial, é indicada terapia antineoplásica sistêmica para câncer de próstata metastático, a qual tem resposta clínica muito limitada e ainda dispõe de poucas alternativas e quimioterápicos disponíveis.

O rastreamento precoce torna-se decisivo na redução das taxas de mortalidade, além de ser fundamental para o controle da progressão do câncer, que ao originar metástases, é considerado incurável (EL BAROUKI, 2012; GABRIOTTI *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2010; PAIVA *et al.*, 2011; ROUS, 2010).

### 1.3.3 Câncer do Colo do Útero

O câncer do colo do útero (CCU) é a segunda neoplasia maligna mais comum entre as mulheres brasileiras e a quarta causa de morte por câncer nesta população (BRASIL, 2007). A causa primária do CCU é a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV). Mais de 100 genótipos deste vírus já foram catalogados, sendo que os dois tipos mais oncogênicos são o HPV16 e o HPV18 – atualmente preveníveis por vacinas (NADAL & MAZIONE, 2006). Juntos, são responsáveis por mais de 70% dos CCU, por cerca de 50% das lesões de alto grau e por 16-32% das lesões cervicais de baixo grau (CLIFFORD *et al.*, 2005; BRASIL, 2006; NADAL & MAZIONE, 2006).

Os fatores de risco relacionados à oncogênese cervical são divididos em dois grandes grupos: os documentados experimentalmente e os clínicos ou epidemiológicos. Dentre os classificados no primeiro grupo, citam-se os fatores imunológicos (resposta imune local e humoral), a associação com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), os fatores genéticos (como o polimorfismo da proteína p53), o tabagismo e o uso prolongado de contraceptivos orais (OLIVEIRA *et al.*, 2003, PINHO *et al.*, 2003). No que se refere aos fatores de risco clínicos ou epidemiológicos, destaca-se o início precoce da atividade sexual, a multiplicidade de parceiros, a baixa escolaridade e renda, o histórico de Doença Sexualmente Transmissível (DST), a obesidade e a distribuição da gordura corporal, traduzindo mais uma vez a possível relação hormonal com os tumores glandulares (LACEY *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; PINHO *et al.*, 2003; CRUZ *et al.*, 2008). A faixa etária das mulheres mais acometidas se encontra entre 35 e 59 anos, podendo, todavia, ocorrer em mulheres ainda na fase da adolescência (CRUZ *et al.*, 2008).

Esta neoplasia é uma afecção progressiva sendo caracterizada por alterações intra-epiteliais cervicais, que podem se desenvolver para um estágio invasivo ao longo de uma a duas décadas. Possuindo etapas bem definidas e de lenta evolução, o CCU permite a interrupção de seu desenvolvimento a partir de um diagnóstico precoce e tratamento oportuno a baixos custos. Dentre todos os tipos de câncer, é o que apresenta um dos mais altos potenciais de cura, chegando perto de 100%, quando diagnosticado precocemente e podendo ser tratado em nível ambulatorial em cerca de 80% dos casos (BRASIL, 2006; DUAVY *et al.*, 2007).

A prevenção primária do CCU está intimamente relacionada a prevenção da infecção pelo HPV, apresentando desafios maiores do que a prevenção da maioria das



outras doenças sexualmente transmissíveis. A infecção pelo HPV é geralmente assintomática e facilmente transmissível. Enquanto existem tratamentos para as lesões verrucosas nos genitais externos causadas por alguns tipos de HPV, não há tratamento para eliminar a infecção persistente, responsável pelo desenvolvimento da neoplasia. A recomendação do uso de preservativos e redução do número de parceiros sexuais pode ajudar as mulheres a reduzir a chance de contaminação pelo vírus, mas o grau em que esta medida afeta a incidência do CCU na população como um todo ainda não pode ser determinada (BRASIL, 2006; PATH, 2000).

No Brasil, a principal estratégia utilizada para detecção precoce do CCU é a realização do exame citopatológico, conhecido popularmente como exame de Papanicolau. A periodicidade de sua realização, estabelecida pelo Ministério da Saúde, está em acordo com as recomendações dos principais programas internacionais (BRASIL, 2006). Além da possibilidade de cura, o tratamento da neoplasia em sua etapa pré-invasora, apresenta um menor custo quando comparado ao custo do tratamento do câncer em seu estágio invasivo (BRENNA *et al.*, 2001; PATH, 2000).

Uma abordagem mais promissora para a prevenção primária são as vacinas contra o HPV. No Brasil estão liberadas para uso a vacina bivalente, que protege contra os tipos 16 e 18, e a quadrivalente, contra os tipos 6, 11, 16 e 18. Os dados obtidos de pesquisas até o momento são encorajadores, mas muito ainda necessita ser esclarecido, principalmente quanto ao custo-efetividade e segurança de programas de vacinação (PATH, 2000; NADAL & MANZIONE, 2006; ELUF NETO, 2008; BRASIL, 2009).

A escolha da terapia mais apropriada e a formulação do prognóstico para uma paciente com câncer são feitas com base no conhecimento clínico sobre a extensão da doença e seu comportamento biológico. Para os carcinomas cervicais, a histerectomia e a radioterapia constituem os métodos terapêuticos mais utilizados. Carcinomas cervicais *in situ* são tipicamente tratados com conização (remoção de um fragmento do colo do útero) ou histerectomia simples (retirada do útero). O emprego da radioterapia no tratamento das neoplasias do colo uterino é fundamental por sua eficácia terapêutica, considerando a alta incidência da doença (STEHMAN *et al.*, 2003).

## 2. JUSTIFICATIVA

Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* são procuradas em todo o mundo, visando o aumento de biomoléculas disponíveis para o uso comercial. No Brasil, não há relatos de pesquisas com toxinas Parasporina, sendo importante o início de pesquisas nessa área, tendo em vista o grande número de isolados brasileiros de Bt armazenados em coleções, com potencial de produção destas toxinas. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui uma coleção de *Bacillus* spp. que conta com aproximadamente 2.500 isolados.

O câncer está relacionado como o principal causador de morte em países economicamente desenvolvidos e como a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. Uma varredura na coleção de *Bacillus* spp. a fim de identificar possíveis estirpes produtoras de Parasporina mostra-se de suma importância para a busca de ativos e valoração dos recursos genéticos microbianos brasileiros, bem como identificação de novas moléculas que acarretem menos efeitos adversos para o tratamento do câncer.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Identificar e caracterizar a produção de proteínas da família Parasporina em isolados de *Bacillus thuringiensis* e testar sua toxicidade contra linhagens de células tumorais.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Identificar estirpes de Bt que possuam genes *parasporina*;
- Analisar o perfil proteico dos cristais produzidos pelas estirpes selecionadas;
- Avaliar a ultraestrutura dos cristais produzidos pelas estirpes selecionadas;
- Determinar a citotoxicidade das toxinas selecionadas sobre células tumorais e não tumorais;
- Analisar as células tumorais quanto a sua morfologia e migração, após tratamento com as proteínas Parasporina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Estirpes de Bt e condições de cultivo

As estirpes utilizadas nesse estudo pertencem à coleção de *Bacillus* spp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (MONNERAT *et al.*, 2001). As bactérias armazenadas nesta coleção são caracterizadas quanto à presença de genes e proteínas Cry e quanto à toxicidade para insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Foram selecionadas aleatoriamente 269 estirpes do banco para varredura inicial à procura de genes *parasporina* (Tabela 2). As cepas de Bt foram cultivadas em meio EMBRAPA (MONNERAT *et al.*, 2007), a 28°C, sob agitação a 200 rpm, em placas de EMBRAPA-ágar a 30°C, por 15-16 h ou LB-ágar (SAMBROOK *et al.*, 2001).

**Tabela 2.** Estirpes de *Bacillus thuringiensis* testadas, sorotipo e local de isolamento.

Estirpe	Sorotipo	Local de Isolamento	Estirpe	Sorotipo	Local de Isolamento
S18	<i>indiana</i>	MS	S188	Ns	PE
S34	<i>thuringiensis</i>	ES	S192	Ns	PE
S62	<i>tolworthi</i>	SC	S198	Ns	PE
S66	<i>tolworthi</i>	SC	S202	<i>tochigiensis</i>	MT
S67	<i>tolworthi</i>	SC	S222	<i>israelensis</i>	SP
S75	<i>tolworthi</i>	GO	S253	<i>tochigiensis</i>	BA
S76	<i>kurstaki</i>	GO	S256	Ns	BA
S80	Ns	GO	S261	Ns	PA
S89	<i>israelensis</i>	França	S264	Ns	PA
S90	<i>tolworthi</i>	MG	S273	Ns	PA
S93	<i>kurstaki</i>	MG	S274	Ns	PB
S95	Ns	MG	S284	Ns	BA
S97	Ns	MG	S292	Ns	BA
S98	Ns	MT	S298	Ns	BA
S109	<i>kenyae</i>	MS	S301	Ns	BA
S121	<i>kurstaki</i>	SP	S308	Ns	PE
S128	<i>kurstaki</i>	França	S316	Ns	RR
S130	<i>morrisoni</i>	EUA	S346	Ns	RR
S135	Ns	MG	S377	Ns	GO
S141	<i>tohokuensis</i>	MG	S383	Ns	GO
S151	Ns	MG	S385	Ns	GO
S154	<i>silo</i>	SP	S396	Ns	PR
S165	<i>israelensis</i>	RR	S398	Ns	PR
S170	Ns	RR	S403	Ns	PR

<b>S175</b>	Ns	BA	<b>S412</b>	Ns	Argentina
<b>Estirpe</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Local de Isolamento</b>	<b>Estirpe</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Local de Isolamento</b>
<b>S430</b>	Ns	TO	<b>S687</b>	Ns	RO
<b>S435</b>	Ns	MG	<b>S690</b>	Ns	RO
<b>S445</b>	Ns	GO	<b>S699</b>	<i>kurstaki</i>	AM
<b>S446</b>	Ns	GO	<b>S700</b>	<i>ostriniaie</i>	AM
<b>S454</b>	Ns	BA	<b>S701</b>	<i>kurstaki</i>	AM
<b>S456</b>	<i>entomocidus</i>	BA	<b>S707</b>	Ns	AL
<b>S458</b>	Ns	RS	<b>S709</b>	Ns	AL
<b>S459</b>	<i>tolworthi</i>	RS	<b>S711</b>	<i>japonensis</i>	PE
<b>S479</b>	Ns	MT	<b>S714</b>	Ns	AP
<b>S484</b>	Ns	MA	<b>S723</b>	Ns	CE
<b>S497</b>	Ns	PA	<b>S725</b>	<i>japonensis</i>	DF
<b>S502</b>	Ns	MT	<b>S728</b>	<i>thuringiensis</i>	PA
<b>S505</b>	Ns	DF	<b>S745</b>	Ns	SP
<b>S506</b>	Ns	DF	<b>S757</b>	Ns	SC
<b>S508</b>	Ns	MT	<b>S764</b>	<i>kurstaki</i>	SC
<b>S512</b>	Ns	SP	<b>S779</b>	Ns	MS
<b>S513</b>	Ns	SP	<b>S780</b>	Ns	AM
<b>S521</b>	Ns	RJ	<b>S802</b>	Ns	ES
<b>S533</b>	Ns	PE	<b>S808</b>	Ns	PE
<b>S538</b>	Ns	ES	<b>S813</b>	Ns	RS
<b>S546</b>	<i>kurstaki</i>	DF	<b>S845</b>	Ns	BA
<b>S550</b>	Ns	MS	<b>S873</b>	Ns	SC
<b>S552</b>	Ns	MT	<b>S874</b>	Ns	BA
<b>S570</b>	<i>kurstaki</i>	SC	<b>S891</b>	Ns	MG
<b>S583</b>	Ns	RR	<b>S906</b>	Ns	PR
<b>S597</b>	<i>galleriae</i>	DF	<b>S907</b>	Ns	PR
<b>S599</b>	<i>kenyae</i>	MS	<b>S908</b>	Ns	PR
<b>S601</b>	<i>thuringiensis</i>	SP	<b>S932</b>	Ns	PB
<b>S603</b>	<i>kurstaki</i>	PR	<b>S934</b>	Ns	PB
<b>S604</b>	<i>kurstaki</i>	PR	<b>S957</b>	<i>israelensis</i>	MT
<b>S605</b>	<i>kurstaki</i>	PR	<b>S958</b>	<i>galleriae</i>	MT
<b>S606</b>	<i>kurstaki</i>	PR	<b>S984</b>	Ns	DF
<b>S607</b>	<i>kurstaki</i>	PR	<b>S1053</b>	Ns	RR
<b>S608</b>	<i>fukuokaensis</i>	PR	<b>S1090</b>	Ns	AP
<b>S609</b>	<i>kurstaki</i>	PR	<b>S1120</b>	Ns	AC
<b>S610</b>	<i>kurstaki</i>	PR	<b>S1121</b>	Ns	AC
<b>S611</b>	<i>kurstaki</i>	PR	<b>S1122</b>	<i>tenebrionis</i>	Argentina
<b>S612</b>	<i>darmstadiens</i>	PR	<b>S1125</b>	Ns	AP
<b>S615</b>	<i>sotto</i>	PR	<b>S1129</b>	Ns	RR
<b>S616</b>	<i>aizawai</i>	PR	<b>S1166</b>	<i>muju</i>	Argentina
<b>S617</b>	<i>kenyae</i>	PR	<b>S1167</b>	<i>darmstadiens</i>	Argentina
<b>S618</b>	<i>thuringiensis</i>	PR	<b>S1168</b>	<i>argentiniensis</i>	Argentina
<b>S619</b>	<i>sooncheon</i>	PR	<b>S1170</b>	<i>muju</i>	Argentina
<b>S655</b>	<i>alesti</i>	PR	<b>S1172</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina
<b>S668</b>	Ns	SE	<b>S1173</b>	<i>muju</i>	Argentina
<b>S675</b>	Ns	GO	<b>S1174</b>	<i>muju</i>	Argentina

<b>S685</b>	Ns	ES	<b>S1176</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina
<b>Estirpe</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Local de Isolamento</b>	<b>Estirpe</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Local de Isolamento</b>
<b>S1178</b>	<i>xianguongies</i>	Argentina	<b>S1294</b>	<i>israelensis</i>	SP
<b>S1179</b>	<i>muju</i>	Argentina	<b>S1295</b>	<i>aizawai</i>	SP
<b>S1180</b>	<i>muju</i>	Argentina	<b>S1296</b>	<i>alesti</i>	SP
<b>S1182</b>	<i>muju</i>	Argentina	<b>S1297</b>	<i>sotto</i>	SP
<b>S1184</b>	<i>darmstadiens</i>	Argentina	<b>S1298</b>	<i>galleriae</i>	SP
<b>S1185</b>	<i>entomocidus</i>	Argentina	<b>S1299</b>	<i>galleriae</i>	SP
<b>S1186</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1300</b>	<i>kurstaki</i>	SP
<b>S1187</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1301</b>	<i>morrisoni</i>	SP
<b>S1188</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1302</b>	<i>morrisoni</i>	SP
<b>S1189</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1303</b>	<i>tolworthi</i>	SP
<b>S1190</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1304</b>	<i>tolworthi</i>	SP
<b>S1191</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1305</b>	<i>sotto</i>	SP
<b>S1192</b>	<i>sotto</i>	Argentina	<b>S1308</b>	Ns	PI
<b>S1201</b>	<i>kurstaki</i>	BA	<b>S1312</b>	Ns	PI
<b>S1202</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1314</b>	Ns	PI
<b>S1203</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1316</b>	Ns	PI
<b>S1204</b>	<i>sotto</i>	Argentina	<b>S1328</b>	Ns	CE
<b>S1205</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1334</b>	Ns	RN
<b>S1207</b>	<i>selouensis</i>	Argentina	<b>S1336</b>	Ns	RN
<b>S1208</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1338</b>	Ns	RN
<b>S1209</b>	<i>kurstaki</i>	Argentina	<b>S1340</b>	Ns	RN
<b>S1225</b>	Ns	SE	<b>S1342</b>	Ns	CE
<b>S1251</b>	Ns	BA	<b>S1365</b>	<i>pakistani</i>	MA
<b>S1256</b>	<i>sotto</i>	SP	<b>S1367</b>	Ns	MA
<b>S1257</b>	<i>aizawai</i>	SP	<b>S1376</b>	Ns	MA
<b>S1258</b>	<i>kurstaki</i>	SP	<b>S1387</b>	Ns	MG
<b>S1259</b>	<i>thuringiensis</i>	SP	<b>S1450</b>	<i>kurstaki</i>	EUA
<b>S1260</b>	<i>galleriae</i>	SP	<b>S1451</b>	Ns	DF
<b>S1261</b>	<i>kenyae</i>	SP	<b>S1456</b>	<i>entomocidus</i>	Argentina
<b>S1262</b>	<i>ostrinae</i>	SP	<b>S1457</b>	<i>kumamotoensis</i>	Argentina
<b>S1263</b>	<i>sotto</i>	SP	<b>S1499</b>	Ns	AC
<b>S1264</b>	<i>kurstaki</i>	SP	<b>S1503</b>	Ns	RO
<b>S1266</b>	<i>entomocidus</i>	SP	<b>S1504</b>	Ns	RS
<b>S1267</b>	<i>finitimus</i>	SP	<b>S1530</b>	Ns	Brasil
<b>S1268</b>	<i>alesti</i>	SP	<b>S1562</b>	Ns	AM
<b>S1269</b>	<i>thuringiensis</i>	SP	<b>S1563</b>	Ns	AM
<b>S1270</b>	<i>entomocidus</i>	SP	<b>S1576</b>	<i>aizawai</i>	México
<b>S1271</b>	<i>canadensis</i>	SP	<b>S1692</b>	Ns	MG
<b>S1282</b>	<i>israelensis</i>	SP	<b>S1702</b>	Ns	Colômbia
<b>S1283</b>	<i>israelensis</i>	SP	<b>S1703</b>	Ns	Colômbia
<b>S1284</b>	<i>israelensis</i>	SP	<b>S1704</b>	Ns	Colômbia
<b>S1285</b>	<i>israelensis</i>	SP	<b>S1722</b>	Ns	Brasil
<b>S1287</b>	<i>israelensis</i>	SP	<b>S1785</b>	Ns	DF
<b>S1288</b>	<i>israelensis</i>	SP	<b>S1791</b>	Ns	DF
<b>S1291</b>	<i>israelensis</i>	SP	<b>S1806</b>	Ns	MG
<b>S1292</b>	<i>israelensis</i>	SP	<b>S1850</b>	Ns	DF

<b>S1293</b>	<i>israelensis</i>	SP	<b>S1878</b>	Ns	SP
<b>Estirpe</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Local de Isolamento</b>	<b>Estirpe</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Local de Isolamento</b>
<b>S1888</b>	Ns	DF	<b>S2193</b>	Ns	-
<b>S1905</b>	Ns	DF	<b>S2195</b>	Ns	-
<b>S1936</b>	Ns	Brasil	<b>S2205</b>	<i>canadensis</i>	Inglaterra
<b>S1960</b>	Ns	RJ	<b>S2209</b>	Ns	-
<b>S1983</b>	Ns	Brasil	<b>S2210</b>	Ns	-
<b>S1989</b>	<i>israelensis</i>	EUA	<b>S2211</b>	Ns	-
<b>S1992</b>	Ns	TO	<b>S2212</b>	Ns	-
<b>S1997</b>	Ns	TO	<b>S2302</b>	Ns	AM
<b>S2005</b>	Ns	TO	<b>S2394</b>	Ns	-
<b>S2016</b>	Ns	DF	<b>S2395</b>	Ns	-
<b>S2020</b>	Ns	DF	<b>S2396</b>	Ns	-
<b>S2032</b>	Ns	-	<b>S2492</b>	Ns	-
<b>S2035</b>	Ns	-	<b>S2493</b>	Ns	-
<b>S2036</b>	Ns	-	<b>S2494</b>	Ns	-
<b>S2037</b>	Ns	-	<b>S2495</b>	Ns	-
<b>S2038</b>	Ns	-			

(Ns) Não sorotipada, ( - ) Origem indeterminada.

#### 4.2 Cultivo de linhagens celulares de mamíferos

Para avaliação da atividade antitumoral das proteínas de *B. thuringiensis*, as linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro. As células de câncer de próstata, DU145, foram cedidas pelo Professor Sergio Verjovski do Departamento de Química da Universidade de São Paulo. A linhagem HeLa de câncer do colo do útero, foi cedida pelo professor Luíz Kanza, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. A linhagem de fibroblasto de polpa dentária humana saudável foi cedida pelo Departamento de Genética e Morfologia, pertencente ao Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

Todas as linhagens, exceto MDA-MB-231, foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco – Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), sendo mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio Leibovitz L15 (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, EUA), na ausência de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) e antibiótico-antimicótico (10.000

unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de Fungizone®) (Gibco - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA).

#### **4.2.1. Descongelamento de células**

Todas as linhagens celulares utilizadas encontravam-se em criotubos conservados e estocados em freezer a -80°C ou nitrogênio líquido. Para se dar início à cultura, criotubos contendo cada uma das linhagens foram retirados dos estoques e descongelados a 37°C. Após o descongelamento, as células foram transferidas para tubo estéril de polipropileno de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura e centrifugados por 5 minutos a 2.000 *x g*. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado de células foi ressuspense em 5 mL de meio de cultura e colocado em garrafa para cultura celular de 25 cm<sup>2</sup>, e incubado em estufa a 37°C.

#### **4.2.2. Passagem de células**

A passagem das células foi feita sempre que as células atingiam confluência próxima a 90%. Os meios de cultura foram descartados das garrafas, sendo estas lavadas brevemente com 5 mL PBS 1X (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – pH 7,4). Após lavagem, o PBS foi descartado e adicionou-se em cada garrafa 1 mL da solução tripsina-EDTA 1X (0,25% de tripsina e 1 mM de EDTA) (Gibco – Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA). As células foram incubadas em estufa a 37°C por 3 minutos ou até que soltassem das placas, conforme acompanhado em microscópio óptico invertido. Para neutralizar o efeito da tripsina sobre as células, foram adicionados a cada garrafa 2 mL do meio de cultura. As células foram ressuspensas, transferidas para um tubo estéril de polipropileno de 15 mL e centrifugadas a 2.000 *x g* por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados resuspensos em 1 mL dos respectivos meios de cultura. Após este procedimento, transferiu-se a quantidade desejada de células para as placas de cultura, que tiveram seu volume completado para 5 mL com o meio de cultura adequado e foram, em seguida, acondicionadas em estufa. As passagens de células foram realizadas a fim de atingir uma confluência e quantidade de células adequadas para que fossem realizados os tratamentos com as toxinas de Bt.



### **4.3 Extração de DNA de *Bacillus thuringiensis***

O DNA total das estirpes foi extraído pelo método rápido descrito por Bravo e colaboradores (BRAVO *et al.*, 1998) com as seguintes modificações. Após crescimento da bactéria em placa de meio EMBRAPA-ágar por 16h, colônias foram retiradas com uma alça de cromo-níquel e adicionadas a 200µL de água deionizada em tubo de polipropileno de 1,5 mL. Os tubos foram colocados em freezer -80°C por 20 minutos. Após o congelamento, os tubos foram colocados em água fervente (100°C) por 10 minutos para lisar as células. Após o choque térmico, as células foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi colocado em novo tubo para ser usado nas reações de PCR.

### **4.4 Desenho dos iniciadores**

Iniciadores específicos para a amplificação dos genes *parasporina* foram desenhados com o auxílio do programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) e do software Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2007). Os iniciadores foram desenhados para anelar internamente na sequência dos genes-alvo, de acordo com as sequências depositadas no GenBank (NCBI, 2013).

### **4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Os ciclos de temperatura consistiram de desnaturação inicial a 94°C/5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C/1 minuto, anelamento a 55°C/1 minuto e extensão a 72°C/1 minuto, seguidos de extensão final a 72°C/5 minutos.

Foram adicionados 5 µl do sobrenadante obtido da extração de DNA (20 ng) à mistura de PCR contendo tampão de *Taq* DNA Polimerase 1X, 0,2 mM dNTP (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada iniciador (“forward” e “reverse”) e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), no volume final de 30µl.

A amplificação foi realizada em termociclador TC-412 (TECHNE). O sucesso da amplificação do DNA foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (SAMBROOK *et al.*, 2001). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo diluído em água na concentração de 1 µg/ml por 20 minutos, e descorado em água

destilada por 10 minutos. Por fim, o gel foi visualizado e fotodocumentado em fotodocumentador Gel Logic 212 PRO (Carestream).

#### **4.6 Solubilização e ativação das toxinas a partir dos cristais**

As culturas de Bt esporuladas após cultivo por 72h, foram centrifugadas à 10.000  $\times$  g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensão em tampão contendo 100mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10,2), e sonicado em pulsos de 1 min “ON”/1 min “OFF”, 3 vezes. Após sonicação, as proteínas foram incubadas sob agitação (50 RPM), a 37°C por 12h. Posteriormente, as pró-toxinas foram centrifugadas a 10.000  $\times$  g por 10 minutos, e o sobrenadante foi dialisado em tampão PBS 0,5X gelado, pH 7,4 com membrana de diálise Spectra/Por® MWCO 12.000 – 14.000 (Thomas Scientific) por 16h. Após diálise, as proteínas foram ativadas com proteases. Estirpes positivas para Parasporina 1 foram tratadas com tripsina (0,3 mg/ml) a 37°C por 1h, enquanto estirpes positivas para Parasporina 3 foram tratadas com proteinase K (10 µg/ml) à 37°C por 1h. A reação foi interrompida com 1 mM de PMSF. As proteínas ativas foram liofilizadas (liofilizador Christ, modelo Alpha 2-4 LD plus), ressuspensa em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino e filtradas em membrana de PVDF de 0,22µm (Millipore). A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### **4.7 Análise do perfil proteico por SDS-PAGE**

As proteínas totais solubilizadas, tanto a pró-toxina (sem tratamento com proteases) quanto a toxina (proteínas ativadas com proteases) foram analisadas através de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 12%), como descrito (LAEMMLI & FAVRE, 1973).

Foram aplicados 15 µL de cada amostra no gel (50µg de proteína), que foi corado em solução corante de Azul de Coomassie (40% metanol, 10% ácido acético e 0,1% de Azul de Coomassie)

#### **4.8 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As estirpes selecionadas foram caracterizadas também quanto à morfologia de suas inclusões cristalinas. Para tal, as estirpes foram cultivadas em 15mL de meio EMBRAPA por 72h para que atingissem mais de 90% de esporulação. O meio com o cultivo foi transferido para tubo de polipropileno de fundo cônico de 50mL e congelado a -80°C por 6 horas. Após congelamento, as amostras foram liofilizadas (liofilizador Christ, modelo Alpha 2-4 LD plus) por 48h. O produto da liofilização foi depositado sobre suportes metálicos (stubs), previamente preparados com fita de carbono para a análise de microscopia. As amostras foram metalizadas com ouro pelo período de 90 segundos, utilizando-se metalizador EMITECH modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

#### **4.9 Detecção de $\beta$ -exotoxinas**

A possível presença de  $\beta$ -exotoxinas termoestáveis nas estirpes de *B. thuringiensis* positivas para os genes *parasporina* foi avaliada usando larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Uma alíquota do sobrenadante da cultura esporulada de Bt (crescida por 72h, 28°C e 200 RPM) foi autoclavada, resfriada e adicionada às larvas de inseto em copo descartável de 50 mL com água destilada (na proporção de 1/10). Outra alíquota do sobrenadante não autoclavado foi imediatamente adicionada às larvas de *A. aegypti*. Foram utilizadas 10 larvas por tratamento, e os tratamentos foram feitos em triplicata. A porcentagem de mortalidade foi registrada 24 horas após inoculação.

#### **4.10 Ensaio de viabilidade celular**

A viabilidade das linhagens celulares utilizadas foi determinada por ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) segundo as recomendações do fabricante. Foram semeadas  $3 \times 10^3$  células por poço de uma microplaca de 96 poços e incubada a 37°C por 24h. Após sua adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de proteína ativada das estirpes positivas para os genes *parasporina*. Como controles do tratamento, foram utilizados poços contendo somente as células em meio de cultura e poços com proteína extraída da estirpe de Bt

acristalífero IPS78/11. Após o período de tratamento (24h), o meio contendo as proteínas ativadas foi descartado, e adicionou-se 150µL de MTT (0,5mg/mL em meio de cultura), incubando as células tratadas em estufa a 37°C por 4 horas. Em seguida, a solução de MTT foi desprezada e 200µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada poço para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram avaliadas em espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). A absorbância do corante foi medida a 595nm em espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA), e a taxa de sobrevivência foi calculada. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. A porcentagem de células viáveis foi determinada comparando a densidade celular das células tratadas com as células controle (em meio de cultura) no mesmo período de incubação, através da fórmula: Viabilidade celular (%) = (OD 595 do tratamento/OD 595 do controle) X 100.

#### **4.11 Cálculo para determinação da concentração inibitória 50 (IC<sub>50</sub>)**

Os valores da concentração inibitória 50 (IC<sub>50</sub>) para a(s) linhagem suscetíveis foram calculados com base nos resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular por MTT com o tratamento das células por 24h. Para tal, a porcentagem de células viáveis foi plotada contra a dose de tratamento em escala logarítmica. O cálculo foi feito utilizando-se programa Polo Plus (LeOra Software, Petaluna, CA, USA), através da análise estatística de Probit (FINNEY, 1971; ROBERTSON *et al.*, 2002).

#### **4.12 Análise das alterações morfológicas**

As análises das alterações morfológicas nas células suscetíveis após tratamento por 24 horas com as proteínas de Bt foi avaliado por microscopia de luz (Microscópio Zeiss Axiovert 100) com magnificação de 20x e as imagens foram capturadas com o auxílio do software AxioVision (Zeiss).

#### 4.13 Ensaio de “Wound Healing”

Para analisar a possível inibição das toxinas de Bt na migração celular das linhagens tumorais suscetíveis, realizou-se o ensaio de “Wound healing”. Foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células por poço, em placas de 6 poços. Após a cultura atingir a confluência de 90%, foi feito um “risco” no meio do poço para remover as células da monocamada, utilizando uma ponteira de micropipeta p200. Essa região livre de células será o local analisado onde estas poderão migrar. As células foram lavadas com PBS 1X, e foi adicionada a toxina ativada no volume final de 1 mL de meio DMEM. Como controle utilizou-se somente 1mL de meio de cultura. Para análise do ensaio, foi utilizado microscópio de luz (Microscópio Zeiss Axiovert 100) com magnificação de 5x. As imagens, o cálculo do espaçamento entre as células e a normalização dos dados foram feitos com o auxílio do software AxioVision (Zeiss) em diferentes períodos (0h, 6h, 12h, 24h e 36h) para acompanhar o comportamento dessas células nas mediações do local “riscado”.

#### 4.14 Bioensaios com insetos-praga

A possível atividade inseticida das estirpes positivas para os genes *parasporina* também foi avaliada.

Todos os insetos utilizados nos bioensaios são oriundos da colônia de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde é feita a criação massal dessas larvas.

As larvas de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* foram criadas, em temperatura de  $28 \pm 4^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12 horas. A alimentação das larvas foi feita com ração para gatos (Schmidt *et al.*, 2001)

As lagartas *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *P. xylostella* foram mantidas a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR, e fotoperíodo de 14:10 horas (luz:escuro), em dieta artificial para *A. gemmatalis* ou *S. frugiperda* (MONNERAT *et al.*, 2007), ou natural (folhas de repolho) para *P. xylostella* (MEDEIROS *et al.*, 2003).

#### **4.14.1 Bioensaio seletivo contra *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti***

Para realização do bioensaio seletivo, o procedimento consistiu em adicionar 25 larvas de segundo ou terceiro estágio de cada espécie de mosquito em dois copos descartáveis de 200 mL contendo 100 mL de água destilada. 1mL da cultura bacteriana cultivada em meio Embrapa por 72h, a 28°C e 200 RPM foi adicionado logo após os insetos. Foram feitas duas repetições para cada estirpe testada, e um copo sem a cultura foi deixado como testemunha. Após 24 horas, fez-se a leitura do número de sobreviventes, determinando as possíveis estirpes tóxicas (MONNERAT & SILVA-WERNECK, 2001, MONNERAT *et al.*, 2005).

#### **4.14.2 Bioensaio seletivo contra *Spodoptera frugiperda***

Foram distribuídos 35 µl da cultura crescida em meio Embrapa por 72h a 28°C e 200 RPM por poço (19,8 µl/cm<sup>2</sup>). Após secagem da cultura bacteriana na dieta, foi adicionada uma larva de 2º estágio por poço em 12 poços de placa de cultura de tecidos de 24 poços. As placas foram fechadas com tampas de acrílico, ligas elásticas e foram incubadas nas mesmas condições de criação dos insetos. As larvas não foram colocadas em grupos devido ao seu hábito canibal. A primeira leitura foi feita 48 horas após o início do ensaio, juntamente com a troca da dieta, e a segunda e última avaliação da mortalidade foi feita no 7º dia. Foram testadas 12 larvas por tratamento, com duas repetições (MONNERAT *et al.*, 2007).

#### **4.14.3 Bioensaio seletivo contra *Anticarsia gemmatalis***

Foi distribuída previamente dieta artificial em copo de 50 ml (15,6 µl/cm<sup>2</sup>) e adicionados 150 µl da cultura por copo. Após secagem, foram adicionadas 10 larvas de 2º estágio. Os copos foram lacrados com tampa de acrílico, incubados nas mesmas condições de criação do inseto. A avaliação da mortalidade foi feita como descrito (MONNERAT *et al.*, 2007). A primeira leitura foi feita 48 horas após início do bioensaio, onde as lagartas foram transferidas para novos copos contendo dieta livre das estirpes de Bt utilizadas. No quinto dia foi feita a última leitura. Foram testadas 10 larvas de *A. gemmatalis* por tratamento, com duas repetições (MONNERAT *et al.*, 2007).

#### **4.14.4 Bioensaio seletivo contra *Plutella xylostella***

Para *P. xylostella*, foram usados pedaços de folhas de repolho (5 cm x 6 cm) (*Brassica oleracea* var. *acephala*) previamente lavado com esponja em água corrente, desinfetado em solução de hipoclorito 0,5% por 20 minutos e enxaguados em água destilada. Na sequência, as folhas foram mergulhadas por 10 minutos em suspensão da cultura diluída 1:10 em dH<sub>2</sub>O contendo espalhante adesivo Extravon (30mL/litro). O espalhante adesivo é adicionado devido à cerosidade das folhas. As folhas foram penduradas com auxílio de cliques para secar verticalmente em caixas de papelão com barbante como suporte. Após secagem e transferência das folhas para placa de Petri estéril descartável (90mm x 15mm), foram adicionadas 10 larvas de 2º estágio de *P. xylostella*. Foram testadas 10 larvas por tratamento, com duas repetições. As placas foram fechadas com filme de PVC transparente e colocadas sob as mesmas condições de temperatura e umidade da sala de criação do inseto. Como controles negativos, foram utilizadas folhas tratadas com água estéril ou PBS, para cada bioensaio. A primeira avaliação da mortalidade foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas vivas foram transferidas para folhas novas livres do bacilo. Ao quinto dia, foi feita a segunda leitura, avaliando-se a mortalidade total das lagartas (MONNERAT *et al*, 2007).

#### **4.15 Análises Estatísticas**

As análises estatísticas para os testes de viabilidade celular e de “Wound Healing” foi feita através da análise de variância simples (ANOVA), utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Foram considerados significativos os valores de *p* menores que 0,05%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenho dos iniciadores

Foram produzidos 5 diferentes iniciadores, um para cada família de Parasporina descrita, exceto as parasporinas 4 e 5, onde apenas um iniciador foi desenhado para ambas (Tabela 3). Esses iniciadores foram testados com o DNA de diferentes estirpes de Bt e demonstrou especificidade e capacidade de identificar os genes *parasporina*.

**Tabela 3.** Iniciadores específicos para os genes *parasporina* desenhados para utilização em estirpes de *Bacillus thuringiensis*.

Gene alvo	Sequência dos primers (5' → 3')*	Tamanho esperado do amplicon	Número de acesso ao Genbank
Parasporina 1	TGGAATGGCTATGAGTGCTTTA TACCAAAAAGTGCCAGAATGATCT	164pb	AB031065 – AY081052 – AB250922 – AB274826 AB274827 – AB375062 – AB250923 – AB274825 AB276125 – AB731600 – AB375062
Parasporina 2	GTYACRGTTCCAGCTCAAAGTAGA CTWAGTGTACCGRAGGTAGYATTT	197pb	AB186914 – AB099515 AB454419
Parasporina 3	TATGCCATCATTTGCAGTAAGG TGCTGTAATCCCTGATTGTAC	228pb	AB116649 – AB116651
Parasporina 4 e 5	ATGGCGATTWTWRATSTTGCGAA CCWGCA YRACCTRGTAAAGGYSWT	743pb/821pb	AB180980 – AB555650
Parasporina 6	ATCAGAACCGTAATTCCAGGAG AAAGCGTTAGCTATTGGACCAG	197pb	AB375063

\* Nos primers degenerados, a sequência é dada de acordo com código para DNA degenerado: W = T ou A; Y = C ou T; R = A ou G; S = C ou G.

### 5.2 PCR

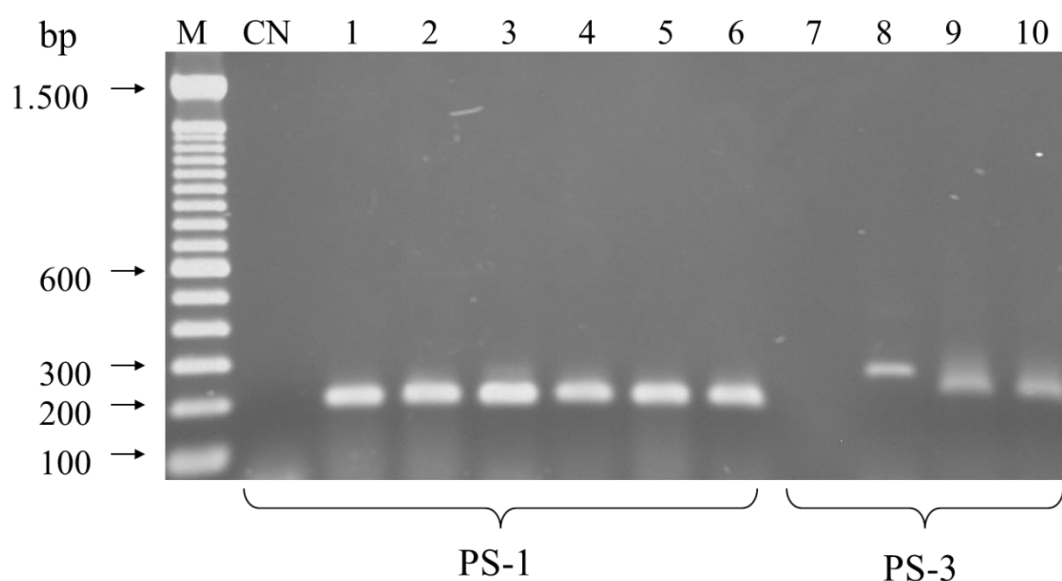
Foram obtidos amplicons apenas nas reações de PCR realizadas com os iniciadores específicos para PS-1 e PS-3. As estirpes S90, S256, S505, S538, S610 S699, S791, S932, S934, S1170, S1172, S1174, S1179, S1182, S1184, S1209, S1257, S1282, S1294, S1295, S1297, S1298, S1299, S1328, S1334, S1338, S1387, S1562, S1936 e S2302 amplificaram produtos de PCR com o tamanho esperado para Parasporina 1 (~164 pb). Já as estirpes S435, S611, S958, S1304 e S2205 amplificaram para a família parasporina 3 (~228pb), indicando a presença dos genes *parasporina* (Figura 8).

Através da técnica de PCR sugere-se a possível presença de genes de Parasporina em estirpes brasileiras de Bt. De um total de 269 estirpes testadas com os



iniciadores específicos para parasporina, apenas 35 estirpes (13%) apresentaram resultados positivos, dos quais 30 (11,15%) deles pertencem à família PS-1, e apenas 5 estirpes (1,85%) com resultados positivos para PS-3. Esses resultados corroboram com a idéia de que estirpes que possuem os genes de Parasporina são relativamente raros nas populações de Bt (GONZALES *et al.*, 2011).

Nenhuma correlação pode ser observada entre os sorotipos e as estirpes positivas para os genes de Parasporina. Foram testadas estirpes de 29 diferentes sorotipos. Oito diferentes sorotipos tiveram resultados positivos com os iniciadores para o gene *parasporina 1* (*kurstaki*, *galleriae*, *muju*, *aizawai*, *israelenses*, *sotto*, *darmstadiens*, *tolworthi*), dentre esses sorotipos, *muju* apresentou 4 estirpes positivas para o gene, sendo o sorotipo mais comum para esse gene. Já para o gene *parasporina 3*, quatro diferentes subespécies tiveram resultados positivos (*kurstaki*, *galleriae*, *tolworthi* e *canadenses*). Cada subespécie obteve representante, não havendo portanto uma predominância de subespécie.



**Figura 8.** Produtos de PCR para genes *parasporina* de estirpes de *B. thuringiensis*. M – Marcador molecular 100pb (Invitrogen); CN – Controle negativo para PS-1 (H<sub>2</sub>O); 1 – S242; 2 – S655; 3 – S1338; 4 – S1387; 5 – S1783; 6 – S2302; 7 – Controle negativo para PS-3 (H<sub>2</sub>O); 8 – S435; 9 – S958; 10 – S2205.

### 5.3 Detecção de $\beta$ -exotoxinas

Através dos bioensaios, foi possível demonstrar que nenhuma das 35 estirpes positivas para os genes *parasporina* apresentou a capacidade de secretar  $\beta$ -exotoxinas no meio de cultura (dados não mostrados), auxiliando na caracterização destas cepas de *B. thuringiensis* que apresentam grande potencial para serem utilizadas no controle do câncer humano.

A detecção de  $\beta$ -exotoxinas através de bioensaios é relativamente simples e não exige equipamentos de alta tecnologia, sendo assim extremamente viável como estratégia de baixo custo para verificar a possível produção dessa toxina em estirpes de *B. thuringiensis*, e dessa forma permitir a utilização dessas estirpes na formulação de bioprodutos (MAC INNES, 2009).

Desde a década de 90, a OMS recomenda a não utilização de estirpes produtoras de  $\beta$ -exotoxinas, além de vários países na Europa exigirem por lei a ausência dessa toxina para comercialização de formulações à base de Bt.

O tempo no qual é detectada a presença da  $\beta$ -exotoxina nos sobrenadantes através dos bioensaios é variável entre as cepas de *B. thuringiensis*. Ao avaliar o sobrenadante do meio cultivado com Bt quanto à presença de  $\beta$ -exotoxinas em diferentes tempos de cultivo, Bekheit e colaboradores (1993) demonstraram um aumento crescente nos níveis de  $\beta$ -exotoxina produzida, sendo os maiores valores encontrados nos maiores tempos de cultivo. Dessa forma, escolheu-se o tempo de 72 horas de cultivo das bactérias para posterior análise da produção dessa toxina.

A detecção de  $\beta$ -exotoxina é um passo importante no desenvolvimento e na produção de produtos baseados em *B. thuringiensis* (MAC INNES, 2009), mesmo este trabalho sendo uma pesquisa de base e inicial sobre as proteínas Parasporinas, é importante a elucidação da presença dessas moléculas, para evitar possíveis entraves na pesquisa e utilização dessas estirpes produtoras de Parasporina.

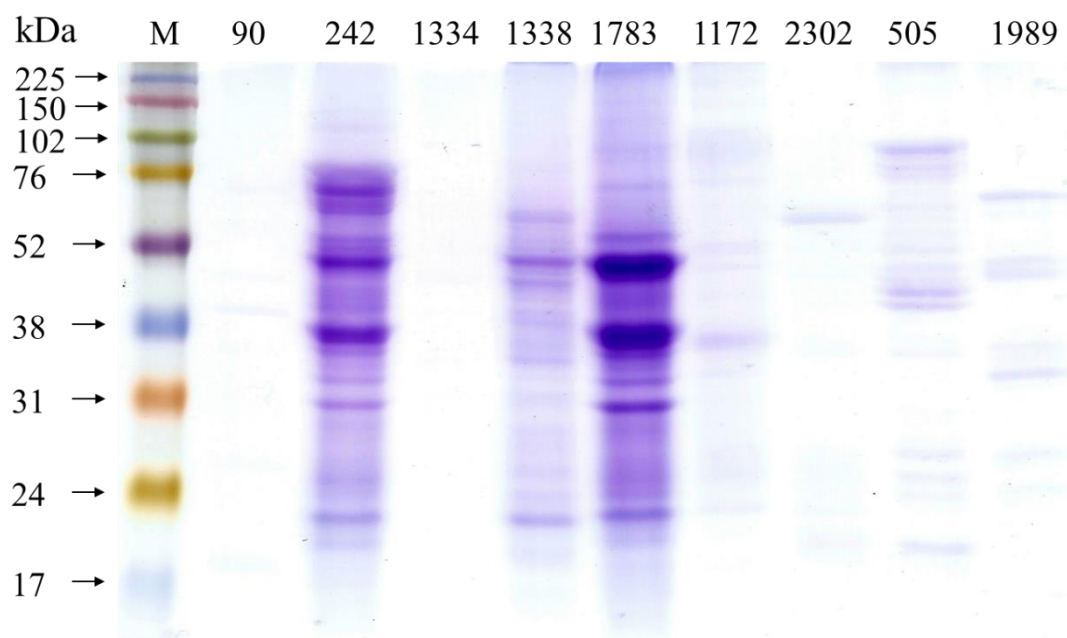
### 5.4 Análise do perfil proteico por SDS-PAGE

A análise das proteínas das estirpes selecionadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE possibilita conhecer o número e a massa molecular das toxinas, além de auxiliar na identificação do possível grupo de Parasporina ao qual pertencem.

Dentre as 35 estirpes positivas para os iniciadores específicos para o gene *parasporina*, 12 delas foram escolhidas aleatoriamente para dar continuidade aos experimentos (7 positivas para o gene *parasporina 1* e 5 positivas para *parasporina 3*).

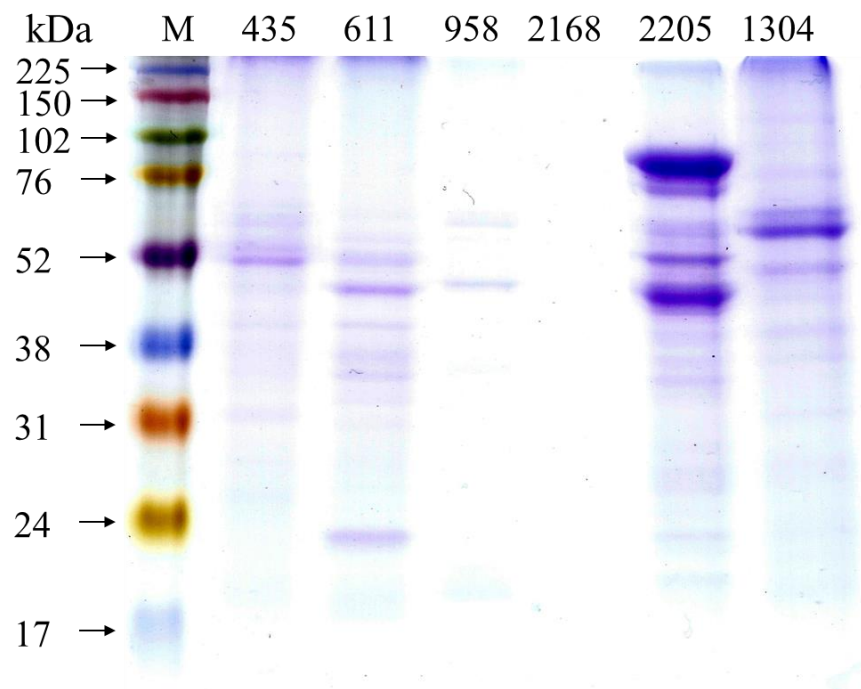
A análise do perfil proteico mostrou que algumas das estirpes positivas por PCR produziam proteínas com o tamanho esperado para as pró-toxinas Parasporinas. As estirpes S505, S1338 e S1172 produziram proteínas correspondentes a Parasporina 1 de ~81 kDa (Figura 9). Já as estirpes S435, S1304 e S2205 produziram proteínas de ~88 kDa, tamanho esperado para Parasporina 3 (Figura 10).

Algumas estirpes positivas por PCR não apresentaram proteínas com os tamanhos esperados para os respectivos genes. Uma possível explicação para essas proteínas não serem observadas no preparado dessas estirpes é a produção em pequena quantidade, de forma que seja indetectável pela técnica utilizada, ou simplesmente não ocorrendo a tradução do gene encontrado. Outra possível explicação seria uma mutação no gene codificante dessa proteína ou a recombinação homóloga dos genes responsáveis por essas proteínas. Esses eventos podem alterar o tamanho original da proteína, como já foi possível demonstrar em uma estirpe produtora de Parasporinas, isolada de uma ilha do Caribe (GONZALEZ *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Perfil eletroforético das proteínas solubilizadas extraídas das estirpes positivas para Parasporina 1. M – Marcador de massa molecular Full-range rainbow (GE Life Science).

Outras estirpes além de produzirem proteínas do tamanho esperado para Parasporina, também produziram proteínas correspondentes ao tamanho de proteínas Cry, como as estirpes S435, S505, S611, S958, S1304, S1338, S2205 e S2302. Elas apresentaram proteínas com o tamanho de 65 kDa, característico dos grupos de proteínas Cry 1 e Cry2, que são ativas contra lepidópteros e dípteros (CRICKMORE *et al*, 2015)



**Figura 10.** Perfil eletroforético das proteínas solubilizadas extraídas das estirpes positivas para Parasporina 3. M – Marcador de massa molecular Full-range rainbow (GE Life Science).

## 5.5 Ensaio de Viabilidade Celular

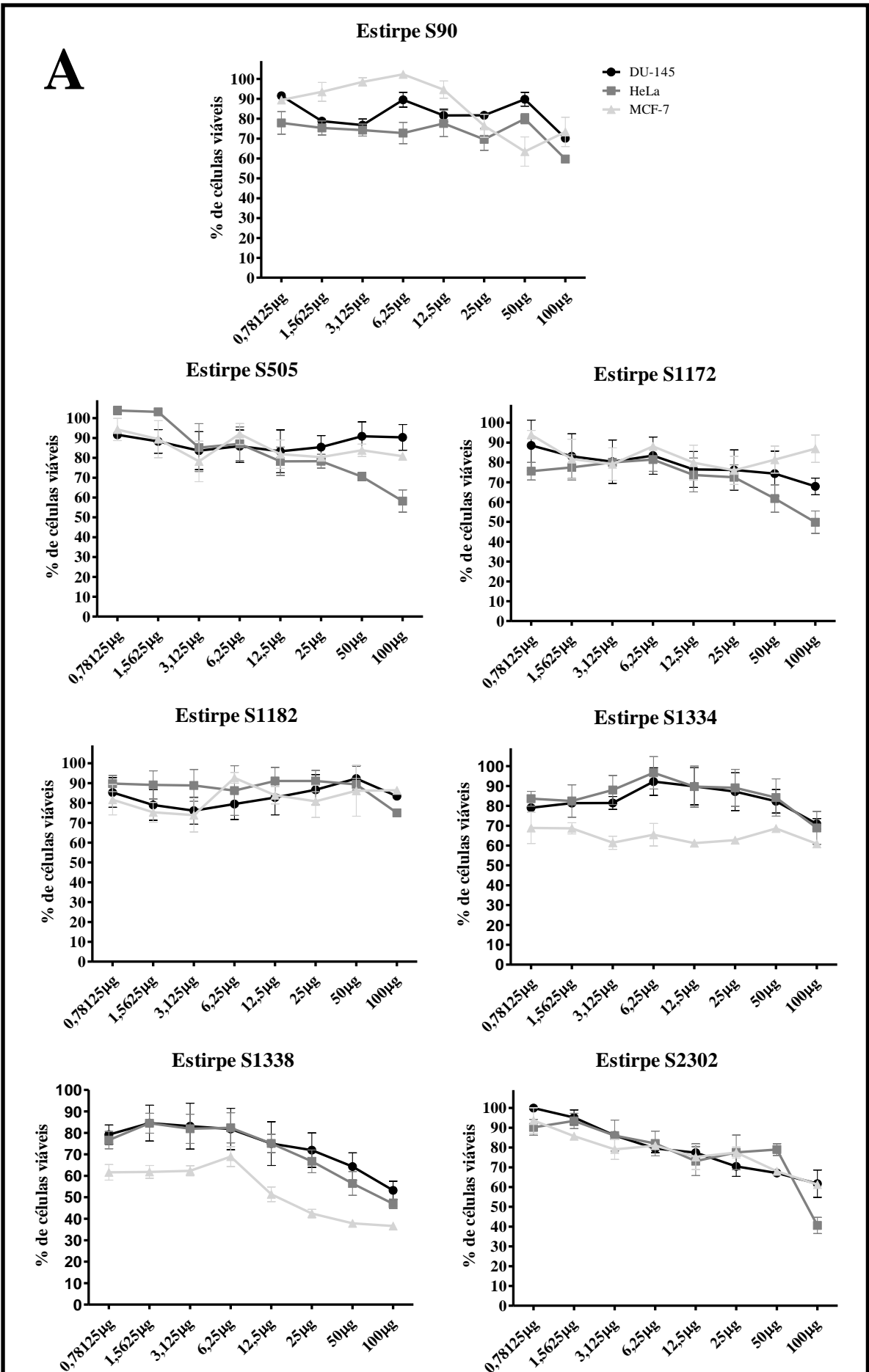
Citotoxicidade é definida como a propriedade que um composto químico possui em causar a morte celular, independente do mecanismo de morte (GRAHAM-EVANS *et al.*, 2003). Esse tipo de ensaio é um método apropriado para varredura com novas substâncias em um período relativamente curto de tempo para determinar sua ação citotóxica em células de câncer (ALLEY *et al.*, 1988).

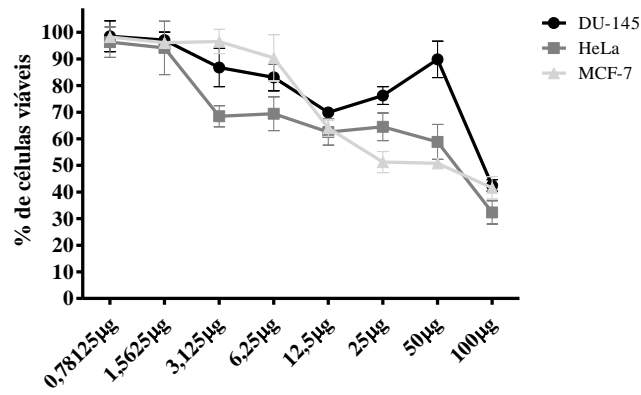
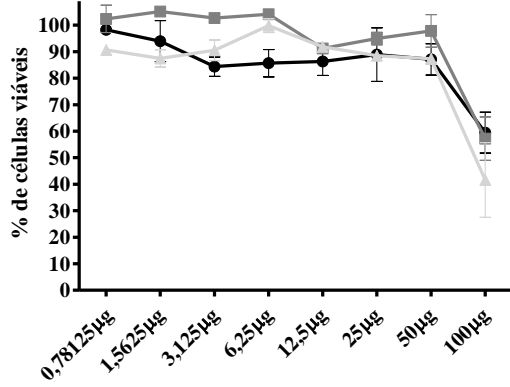
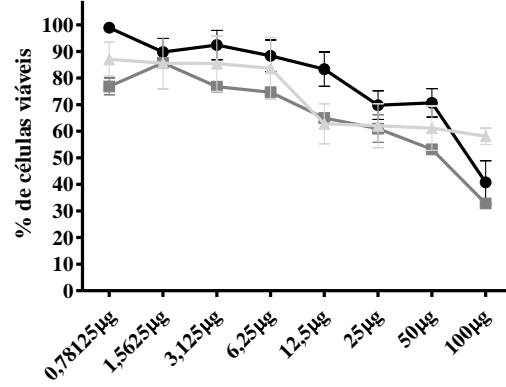
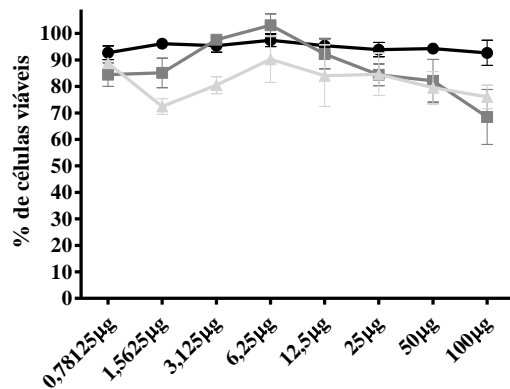
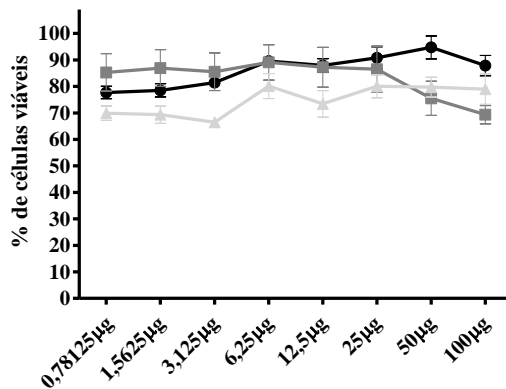
Foram utilizadas duas estirpes de Bt como controle. A primeira utilizada como controle negativo, IPS 78/11, sofreu cura plasmidial não produzindo cristais proteicos (Ward & Ellar, 1983). A segunda, estirpe S1989, foi utilizada como controle positivo tendo em vista a sua produção de proteínas Cyt2Ba. Essa toxina com atividade hemolítica não possui um receptor específico, ligando-se inespecificamente a lipídeos de membrana e sendo por este motivo, tóxica a todas as linhagens testadas, mesmo em pequenas concentrações (Figura 11C) (CORRÊA *et al.*, 2012).

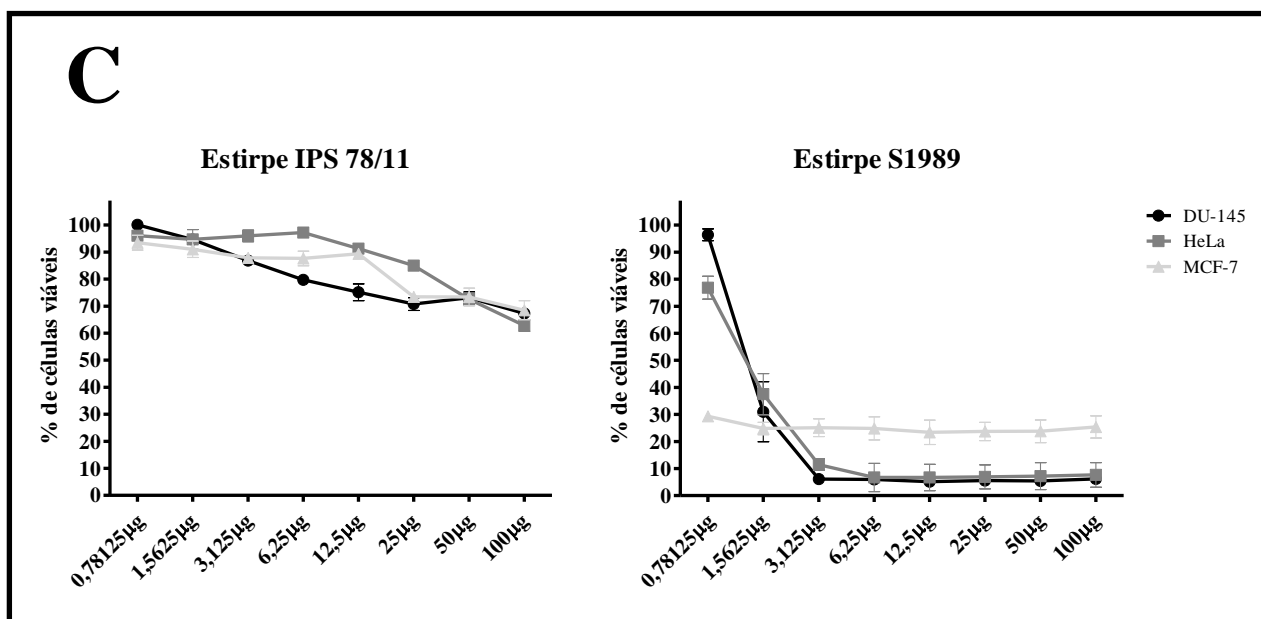
O ensaio de viabilidade celular demonstrou que a maioria das estirpes testadas apresentou alterações significativas na viabilidade das linhagens de câncer somente em tratamentos com concentrações muito altas da proteína (100µg), tanto para as estirpes positivas para Parasporina 1 (Figura 11A) quanto para as estirpes positivas para Parasporina 3 (Figura 11B). Apenas a estirpe S1338 apresentou uma diminuição de viabilidade específica contra a linhagem MCF-7, mesmo em concentrações pequenas (< 15,0µg).

Os testes para detecção de  $\beta$ -exotoxinas, juntamente com a especificidade citotóxica encontrada nas proteínas de S1338 contra MCF-7 levam a acreditar que a toxicidade causada pela estirpe testada deve-se a possível presença da Parasporina 1 produzida por esse isolado e não por qualquer outra molécula produzida por Bt. Além disso, essa idéia é reforçada pela amplificação por PCR com iniciadores específicos para PS1, tratando-se de uma proteína da família Parasporina com características únicas.

Testes feitos com outras PS1 já descritas, demonstraram toxicidade apenas contra células de câncer do colo do útero, câncer hepático e células T leucêmicas (OHBA *et al.*, 2009). Esse é o primeiro relato de toxicidade de Parasporina 1 contra células de câncer de mama.

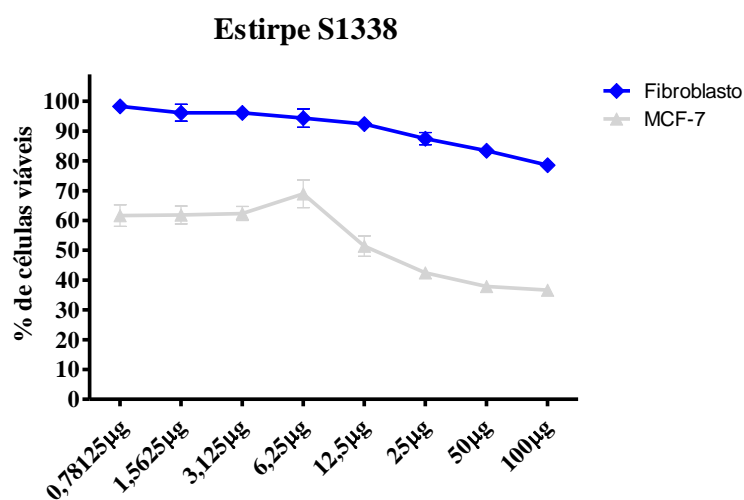


**B****Estirpe S435****Estirpe S611****Estirpe S958****Estirpe S1304****Estirpe S2205**



**Figura 11.** Ensaio de viabilidade celular com diferentes concentrações de proteínas de Bt contra as linhagens DU-145, MCF-7 e HeLa. A: Estirpes positivas para Parasporina 1. B: Estirpes positivas para Parasporina 3. C: Controle negativo IPS 78/11 e controle positivo S1989. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA.  $p < 0,05$ .

Para testar a citotoxicidade específica de S1338 contra MCF-7, e descartar a sua toxicidade contra células não cancerosas, utilizou-se fibroblastos extraídos de polpa dental humana (Figura 12). A maior dose da toxina testada (100µg), apresentou viabilidade celular de 78,5% quando comparadas ao controle, mostrando ter uma baixa citotoxicidade contra células saudáveis. Esse resultado além, de mostrar a não citotoxicidade dessas toxinas a células não cancerosas, reforça a ação específica da possível toxina Parasporina de S1338 contra a linhagem de câncer de mama MCF-7.

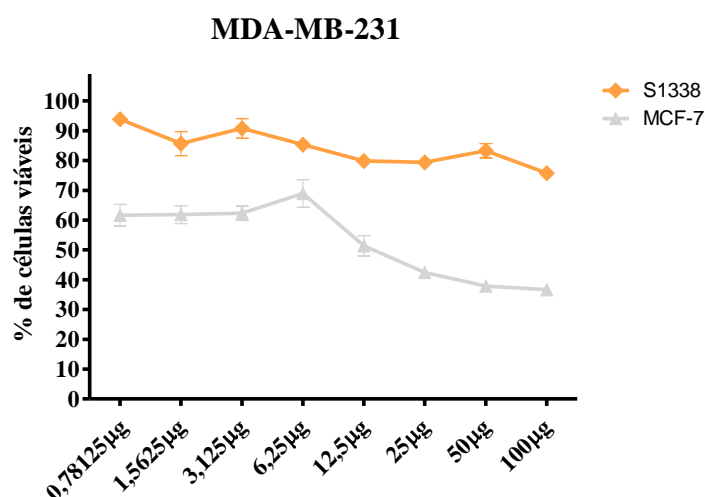


**Figura 12.** Ensaio de viabilidade com diferentes concentrações de proteína da estirpe S1338 contra a linhagem de Fibroblasto de polpa dental e a linhagem de Câncer de Mama MCF-7. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA.  $p < 0,05$ .



As células MCF-7 são linhagens de carcinoma ductal invasivo, positivo para receptores de estrogênio, além de expressarem EGF. Baseado nos resultados positivos na inibição da viabilidade celular dessa linhagem, utilizou-se outra linhagem de câncer de mama para avaliar a possível toxicidade dessa proteína em células com características bioquímicas e fisiológicas diferentes. As células escolhidas, MDA-MB-231, são oriundas de adenocarcinoma e são triplo negativas, ou seja, não expressam receptores tipo 2 para fator de crescimento epidérmico humano, para estrogênio e progesterona.

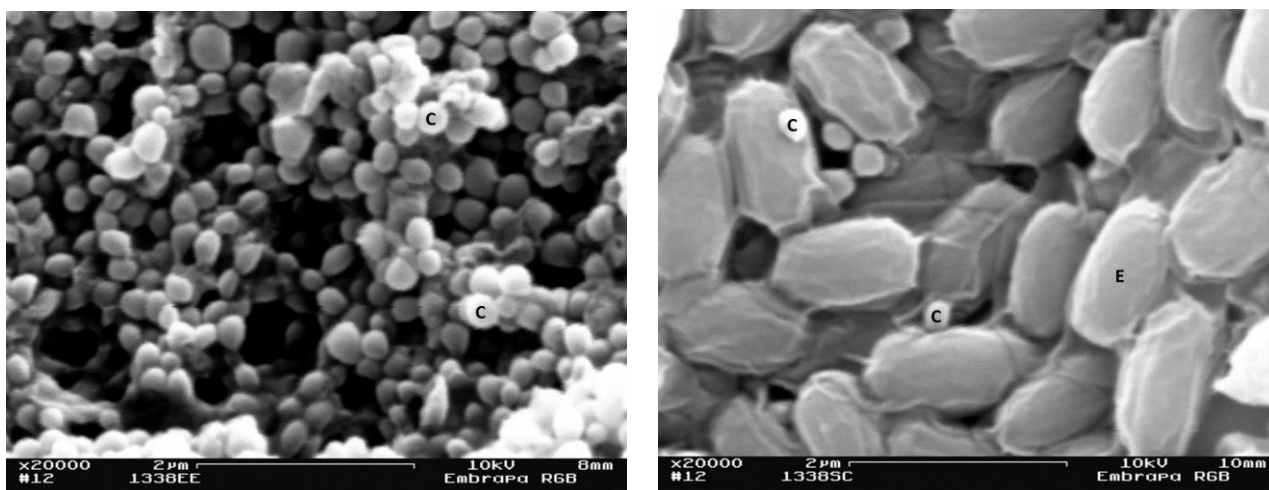
O ensaio de viabilidade com as toxinas de S1338 contra a linhagem MDA-MB-231 mostrou pouca citotoxicidade mesmo em altas concentrações (100µg), com 75,8% de células viáveis (Figura 13). Possivelmente, essas diferenças fisiológicas e bioquímicas entre as duas linhagens de câncer de mama seja a responsável por essa diferença tão grande na citotoxicidade.



**Figura 13.** Ensaio de viabilidade com diferentes concentrações de proteína da estirpe S1338 contra a linhagem MDA-MB-231. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA.  $p < 0,05$ .

## 5.6 Caracterização morfológica dos cristais por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica dos cristais por microscopia eletrônica de varredura foi realizada apenas com a estirpe S1338, representante positivo para Parasporina 1. A análise das imagens mostrou que a estirpe S1338 possui em sua maioria cristais esféricos (Figura 14), sugerindo que esse formato de cristal está relacionado com a proteína Parasporina 1 encontrada.



**Figura 14.** Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporo/cristal da estirpe de Bt S1338, mostrando a predominância de cristais esféricos. (C, Cristais, E, esporos).

A presença de cristais na análise ultraestrutural de estirpes de *B. thuringiensis* é a principal característica que distingue esta espécie de *Bacillus* das outras (SEZEN *et al.*, 2010). Estas diferentes formas assumidas pelos cristais podem conter informações sobre sua toxicidade (TAILOR *et al.*, 1992; LERECLUS *et al.*, 1993; HABIB & ANDRADE, 1998). A morfologia dos cristais diz muito sobre sua atividade inseticida, porém sabe-se muito pouco sobre a relação entre a morfologia dos cristais e a possível associação com proteínas Parasporina. Estudos comparativos entre produção de Parasporina e a análise ultraestrutural desses cristais podem ser futuramente uma ferramenta para reconhecimento de estirpes produtoras dessas proteínas.

### 5.7 Análise das alterações morfológicas

O conceito de morte celular por apoptose, contrastando com o de necrose, foi proposto há 39 anos por KERR *et al.* (1972). Enquanto a apoptose é descrita como um fenômeno ativo, altamente ordenado a ponto de ser chamada de morte programada, a necrose é um processo passivo, que ocorre de maneira abrupta ou acidental, resultado de perturbações químicas ou físicas, com a liberação descontrolada de conteúdo celular e mediadores (CHAUFFAILLE, 2005).

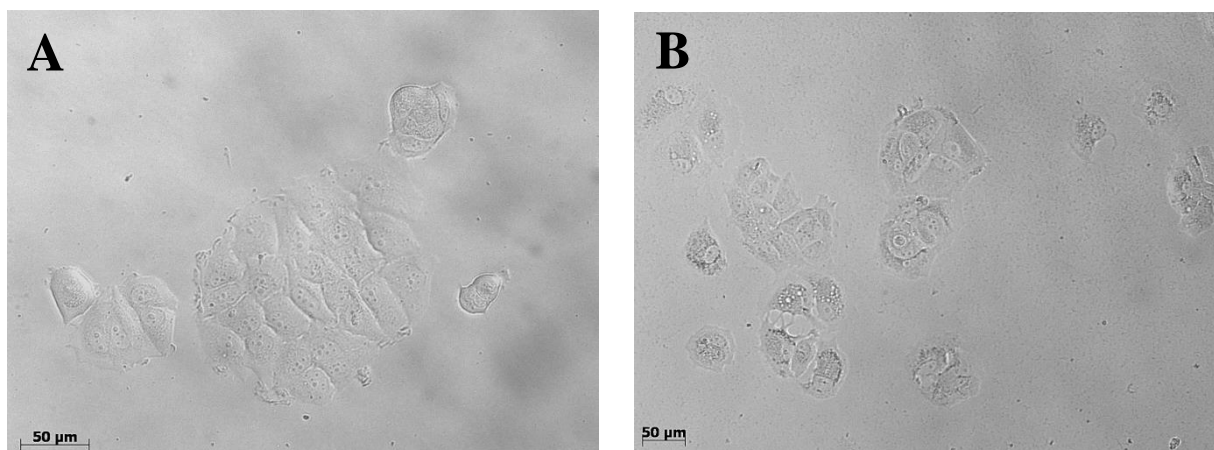
Células morrem por apoptose com modificações de suas características morfológicas e bioquímicas. Neste processo, o envelope nuclear se desfaz, a cromatina nuclear se condensa quebrando posteriormente em fragmentos, o citoesqueleto colapsa promovendo o encolhimento e condensação da célula. Na superfície celular há a formação de bolhas e, se a célula for grande, frequentemente quebra-se em fragmentos envolvidos por membranas chamados de corpos apoptóticos. Ressalta-se que a superfície da célula ou dos corpos apoptóticos torna-se quimicamente alteradas, sendo assim rapidamente engolfada por uma célula vizinha, ou um macrófago, antes que possa liberar seus conteúdos. Dessa maneira, a célula morre de forma “limpa” e é rapidamente eliminada, sem causar uma resposta inflamatória prejudicial (HOU *et al.*, 2005, ALBERTS *et al.*, 2008)

Uma família de proteínas citosólicas, as caspases, desempenham papel essencial na execução das vias de morte celular. Estas são sintetizadas na célula como precursoras inativas, ou procaspases. Uma vez ativadas, as caspases clivam e ativam outras procaspases, resultando em uma cascata proteolítica amplificada, culminando na morte da célula.

As caspases requeridas para a apoptose variam de acordo com o tipo celular e o estímulo. A inativação do gene de camundongo que codifica a caspase-3, uma caspase executora, por exemplo, reduz a apoptose normal no desenvolvimento do cérebro (ALBERTS *et al.*, 2008), sugerindo que a ativação da caspase 3 é um evento inicial crítico na promulgação da cascata apoptótica (OBERHAMMER *et al.*, 1993; ECK-ENRIQUEZ *et al.*, 2000).

Através de imagens capturadas antes e após o tratamento (24 horas) com a proteína Parasporina 1 ativada (50µg) da estirpe S1338, foi possível observar algumas mudanças nas características morfológicas das células MCF-7 (Figura 15), típicas de apoptose, tais como: diminuição do tamanho das células, aquisição de uma morfologia mais arredondada representada por perdas dos pontos de adesão focal, redução da densidade celular e formação de vesículas no interior do citoplasma.

O modo de ação da Parasporina 1 proposto por Katayama e colaboradores (2007) envolve o influxo de cálcio extracelular para o interior citoplasmático, após ligação da toxina Parasporina 1 a um receptor de membrana. Esse aumento intracelular de cálcio irá gerar a ativação proteolítica de uma caspase efetora, a caspase 3, iniciando a cascata proteolítica intracelular e a morte por apoptose.



**Figura 15.** Alterações morfológicas em células MCF-7 após 24h de tratamento com Parasporina 1 da estirpe S1338. Células MCF-7 foram tratadas com 50µg da proteína Parasporina 1 ativada e as alterações morfológicas foram analisadas sob microscópio de luz invertido. A: Células sem tratamento com toxinas de Bt fografadas 24 horas após troca do meio de culutra (controle). B: Células tratadas com a toxina de S1338 após 24 horas, demonstrando características morfológicas típicas de apoptose.

Sabe-se que a linhagem de carcinoma de mama MCF-7 não expressa caspase 3, como resultado de uma deleção de 47pb no exon 3 do gene casp-3. O resultado da deleção é o “silenciamento” do exon 3 durante o splicing do pre-mRNA, bloqueando assim a tradução do mRNA de casp-3. (JANICKE *et al.*, 1993). Portanto, o modo de ação proposto por Katayama não parece se aplicar a linhagem MCF-7 tratada com a proteína PS1 da estirpe S1338. Outro mecanismo de ação ainda desconhecido pode estar envolvido com a morte dessas células, provavelmente envolvendo outras caspases. As caspases iniciadoras 8 e 9 podem levar células a apoptose através da ativação não só da caspase 3, mas também de caspase 7, podendo esta estar relacionada com essa via de morte (COHEN, 1997; FRASER & EVAN, 1996; SRINIVASULA *et al.*, 1996).

Um possível receptor para Parasporina 1, a Beclin 1 encontrada na membrana celular, foi reportado por Katayama e colaboradores (2011). Em mamíferos, Beclin 1 existe em linhagens de células de carcinoma de mama epitelial com uma expressão limitada, mas são abundantes em epitélio normal de mama (LIANG *et al.*, 1999). Esse receptor tem um papel fundamental nos processos de autofagia e é crucial em várias vias de todas as espécies eucarióticas (WIRAWAN *et al.*, 2012).

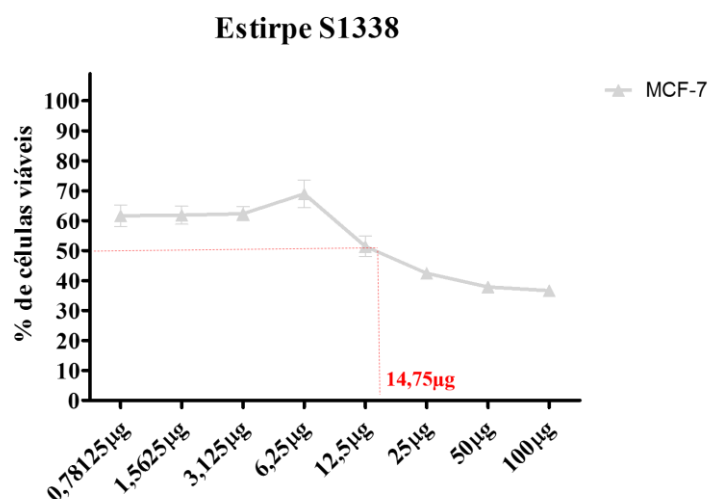
Apesar da interação da Parasporina 1 com Beclin 1 e o seu mecanismo citotóxico ainda não terem sido elucidados, essa possível interação explicaria em parte a toxicidade específica contra a linhagem de câncer de mama MCF-7. Porém, quando a Parasporina 1 foi testada com a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, a toxicidade foi drasticamente reduzida, mesmo em altas concentrações da toxina,

sugerindo que a PS1 aqui encontrada possivelmente possui outro receptor ligado à sua ação citotóxica.

Estudos complementares que visem elucidar quais moléculas estão envolvidas nessa possível via alternativa de morte celular irão auxiliar no tratamento de linhagens de câncer que também possuem essa particularidade. Além disso, a Parasporina 1 aqui estudada possui grande potencial para ser utilizada contra outras células cancerosas com mutação na caspase-3.

## 5.8 Determinação do IC<sub>50</sub>

A partir dos resultados do teste de viabilidade celular, foi determinada a concentração das toxinas necessária para inibir o crescimento de cada linhagem celular em 50%, usando o método estatístico de Probit. As proteínas da estirpe S1338 apresentaram o menor valor de IC<sub>50</sub> para a linhagem MCF-7, de 14,75µg/mL (Figura 16). O IC<sub>50</sub> dos outros extratos proteicos foram maiores que 50µg/mL, para todas as linhagens testadas. Por esse motivo, os outros experimentos foram realizados utilizando apenas as proteínas extraídas da estirpe S1338.



**Figura 16.** Cálculo para determinação do IC<sub>50</sub> da toxina de S1338 contra a linhagem de Câncer de Mama MCF-7.

De acordo com as orientações do Instituto Nacional de Câncer dos EUA, a Parasporina 1 é uma forte candidata para utilização como agente no controle de câncer de mama, pois o valor de IC<sub>50</sub> foi menor que 20µg/ml contra a linhagem MCF-7 após tratamento por 24 horas (BOYED *et al.*, 1997). É importante ressaltar que o IC<sub>50</sub>

determinado com estes testes é do extrato total das proteínas solubilizadas e ativadas. Possivelmente após purificação e obtenção dessa proteína pura, o valor de IC<sub>50</sub> poderá diminuir consideravelmente.

É inegável que as parasporinas têm um potencial para desenvolvimento de novas substâncias anticarcinogênicas. Contudo, sabe-se que a maioria dos resultados foram obtidos em testes *in vitro*, o qual apenas simula sistemas biológicos. El-Hag & Safti (2011) em um dos poucos estudos *in vivo* disponíveis, utilizaram uma estirpe de Bt do sorotipo *dakota* para testar sua capacidade de destruir células de câncer em camundongos. O autor observou um aumento significativo na sobrevivência dos roedores tratados quando comparados ao grupo controle. Além disso, o número de metástases diminuiu, chegando até a desaparecer em alguns casos. De acordo com os autores, esse aumento no tempo de sobrevivência pode ser atribuído ao aumento da resistência a tumores nos camundongos tratados.

Apesar do mecanismo da ação citotóxica das parasporinas ainda não ser completamente compreendido, há um grande interesse na utilização dessas toxinas como possíveis tratamentos para o câncer. Wong (2009) avaliou a ocorrência de competição entre sítios ativos de drogas anti-câncer comerciais e as proteínas Parasporinas. Utilizando microscopia confocal para analisar os sítios de ligação, os quais foram marcados com biotina, o autor demonstrou que haviam poucos sítios em comum, ocorrendo uma pequena competição (< 30%), mas sem efeitos significativos. Isso demonstra que as Parasporinas de Bt têm o potencial de ser uma nova ferramenta no tratamento de células de câncer, e que elas podem ser usadas sem interferir nos tratamentos terapêuticos atuais.

## **5.9 Ensaio de “Wound Healing”**

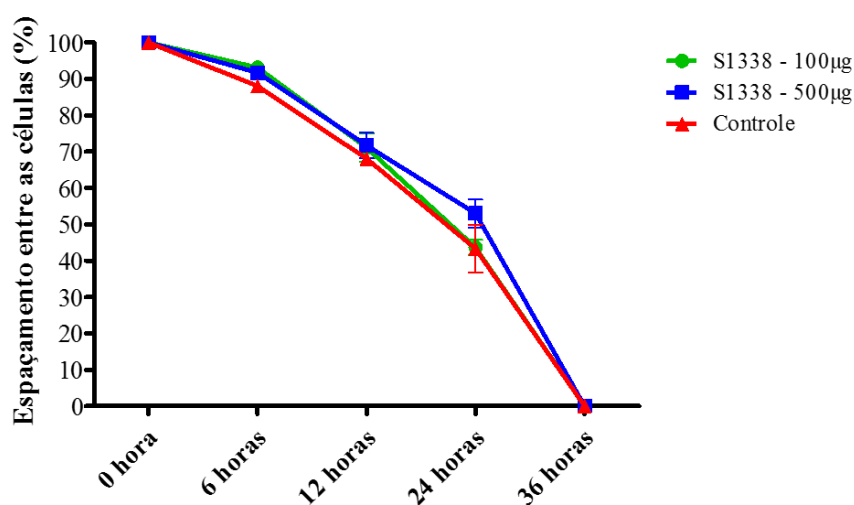
A migração celular é definida como o movimento de células individuais, camadas celulares ou aglomerados de um local para outro (FRIEDL *et al.*, 2000, 2003). Esse fenômeno é de grande importância para uma variedade de processos fisiológicos e patológicos em vários ramos da biologia, incluindo crescimento celular e diferenciação, câncer e inflamação (HORWITZ *et al.*, 2003; ECCLES *et al.*, 2005). É um processo altamente regulado, envolvendo uma contínua formação e deformação de pontos de contato com o substrato, conhecidos como adesões focais, os quais servem como base

para o deslocamento e também como centros de sinalização (RIDLEY *et al.*, 2003; ROMER *et al.*, 2006). Esses pontos de adesões focais ligam as integrinas com as actinas do citoesqueleto, controlando o potencial migratório das células (GEIGER & BERNSHADSKY, 2001; WEBB *et al.*, 2003). Apesar da grande importância, os mecanismos moleculares controlando esses eventos permanecem com poucas definições (VICENTE-MANZANARES *et al.*, 2005; MOISSOGLU & SCHWARTZ, 2006).

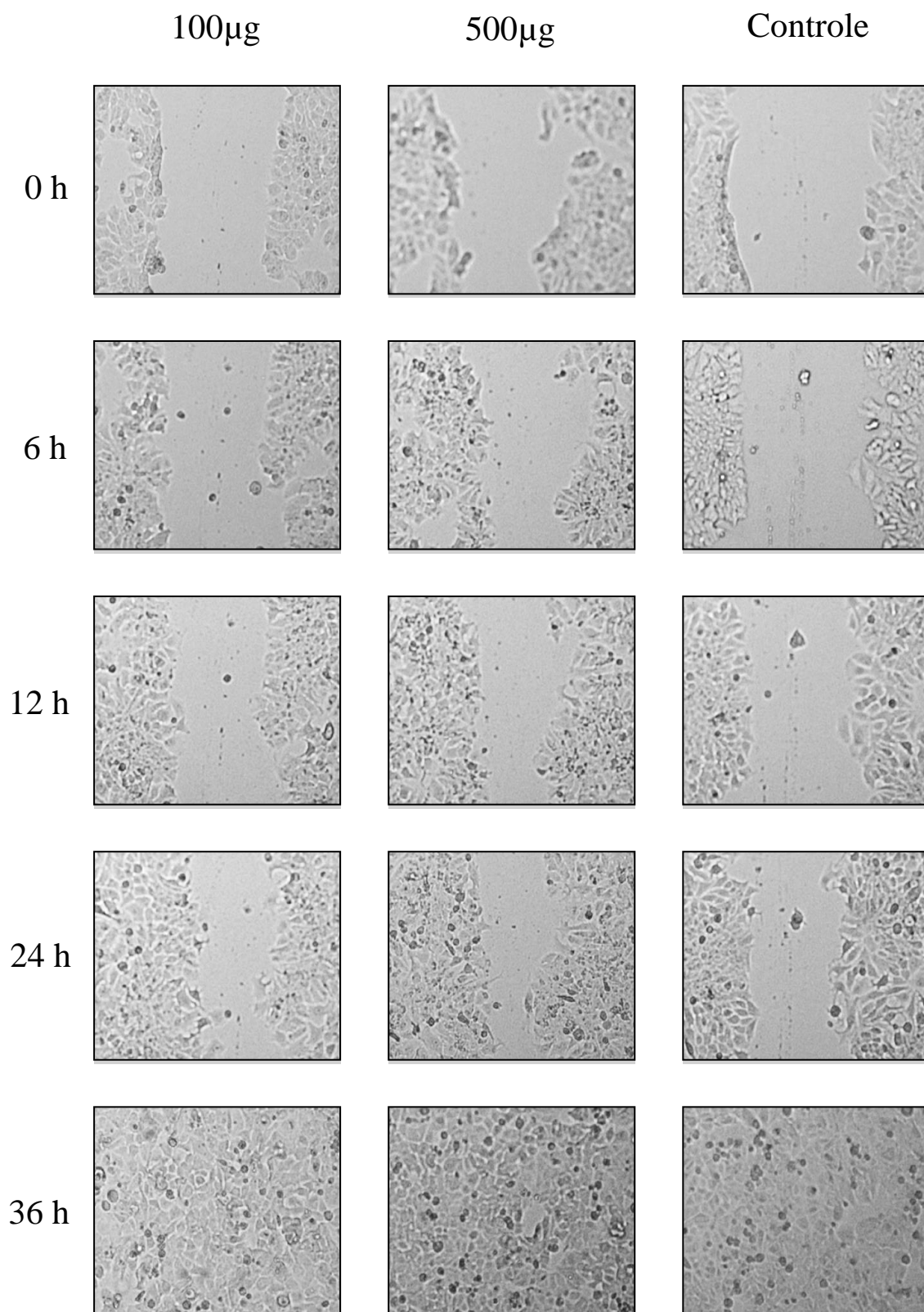
Uma das maiores vantagens em utilizar esse método simples e barato, é a capacidade de mimetizar a migração de células *in vivo*. A criação de um espaçamento entre as células possibilitou a análise da capacidade do extrato proteico testado de inibir a migração celular em diferentes períodos (Figuras 17 e 18).

Os dois tratamentos com diferentes concentrações da proteína Parasporina 1 da estirpe S1338 (100µg e 500µg) não mostraram durante o período de tratamento diferenças estatísticas significativas no espaçamento entre as células, quando comparadas ao controle. Portanto, esses dados sugerem que a toxina testada não inibe a migração celular na linhagem MCF-7 nas concentrações testadas.

Como o possível mecanismo de ação dessa proteína está relacionado com a ligação com receptores de membrana e a apoptose celular, provavelmente PS1 não atue nos mecanismos envolvidos com o processo de migração, não alterando as características de migração dessa linhagem tumoral, tendo em vista que para que isso aconteça seja necessário moléculas que interajam com os pontos de adesão focal e os mecanismos envolvidos nesse microambiente.



**Figura 17.** Ensaio de “Wound Healing”. Análise do espaçamento entre as células em diferentes tempos (0h, 6h, 12h, 24h e 36h) após administração de diferentes concentrações (100µg e 500µg) das proteínas de S1338. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA.  $p < 0.05$ .



**Figura 18.** Análise das imagens capturadas em ensaio de migração de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de proteínas da estirpe S1338.



## 5.10 Bioensaio seletivo contra *C. quinquefasciatus*, *A. aegypti*, *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *P. xylostella*

As 35 estirpes positivas no PCR foram testadas contra lepidópteros e dípteros. Dentre estas, mais da metade (18 estirpes) causaram mortalidade acima de 50% em pelo menos um dos insetos utilizados no bioensaio. Quatro estirpes apresentaram toxicidade de 100% contra larvas de *A. gemmatalis* (S1172, S1295, S1298 e S1304) e uma estirpe mostrou 100% de mortalidade contra *S. frugiperda* (S1304). Uma única estirpe (S958) mostrou toxicidade alta (entre 71% e 90%) contra *P. xylostella*. Já contra os dípteros *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* apenas o isolado S1295 apresentou uma alta toxicidade (entre 71% e 90%).

Pode-se observar que as estirpes tóxicas pertenciam aos sorotipos *kurstaki* (S610, S611, S1172 e S1209), *galleriae* (S958, S1298, S1299), *muju* (S1170, S1174, S1182), *israelensis* (S1282, S1294) *aizawai* (S1257, S1295), *tolworthi* (1304), *sotto* (S1297) e apenas uma estirpe (S1328) não era sorotipada. Entretanto as pertencentes aos sorotipos *darmstadiensis* (S1184) e *canadensis* (S2205) não foram tóxicas a nenhum dos insetos testados. Além dessas, 13 estirpes não sorotipadas também não mostraram toxicidade. Os resultados de toxicidade de todas as estirpes testadas podem ser visualizados na tabela 4.

É interessante mencionar que as estirpes dos sorotipos *aizawai*, *kurstaki* e *galleriae* são conhecidas na literatura como tóxicas a insetos da ordem Lepidoptera e normalmente apresentam as toxinas Cry1A e Cry2A, descritas como tóxicas a lepidópteros e dípteros (KWA *et al.*, 1998; MONNERAT *et al.*, 1999; IBARGUTXI *et al.*, 2006; PIGOTT & ELLAR, 2007).

Estirpes de Bt da subespécie *israelensis* produzem inclusões protéicas compostas por proteínas Cry altamente tóxicas para mosquitos, como Cry11A, Cry4A e Cry4B (Bravo *et al.*, 2007). Em nossos resultados, as duas estirpes que obtiveram maior toxicidade contra dípteros pertenciam a essa subespécie (S1282, S1294).

Esses resultados, juntamente com o ensaio de viabilidade celular, confirmam a correlação de que estirpes produtoras de Parasporina não produzem cristais com proteínas inseticidas (MIZUKI *et al.*, 1999, OHBA *et al.*, 2009). Apesar de várias dessas estirpes possuírem os genes de Parasporina, apenas o isolado S1338 mostrou toxicidade significativa contra a linhagem

MCF-7 de câncer, e ao mesmo tempo não mostrou qualquer atividade inseticida contra os insetos testados.

**Tabela 4.** Resultado dos bioensaios utilizando as estirpes positivas para os genes *parasporina* contra lepidópteros e dípteros.

Estirpe	<i>S. frugiperda</i>	<i>A. gemmatalis</i>	<i>P. xylostella</i>	<i>A. aegypti</i>	<i>C. quinquefasciatus</i>
S90	-	-	-	-	-
S256	-	-	-	-	-
S435	-	-	-	-	-
S505	-	-	-	-	-
S538	-	-	-	-	-
S610	++	++	++	-	-
S611	++	++	++	++	++
S699	-	-	++	-	-
S791	-	-	-	-	-
S932	-	-	-	-	-
S934	-	-	-	-	-
S958	-	-	+++	-	-
S1170	-	++	-	-	-
S1172	-	++++	-	-	-
S1174	-	++	-	-	-
S1179	-	+	-	-	-
S1182	-	++	-	-	-
S1184	-	-	-	-	-
S1209	++	++	-	-	-
S1257	-	++	-	-	-
S1282	-	++	-	++	++
S1294	-	+	-	++	++
S1295	++	++++	-	+++	+++
S1297	-	++	-	-	-
S1298	-	++++	++	-	-
S1299	-	++	-	++	++
S1304	++++	++++	-	-	-
S1328	-	++	-	-	-
S1334	-	-	-	-	-
S1338	-	-	-	-	-
S1387	-	-	-	-	-
S1562	-	-	-	-	-
S1936	-	-	-	-	-
S2205	-	-	-	-	-
S2302	-	-	-	-	-

(-) Patogenicidade negativa, (+) Patogenicidade de até 49%, (++) Patogenicidade entre 50% e 70%, (++++) Patogenicidade entre 71% e 90%, (+++++) Patogenicidade acima de 90%.

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho possibilitou a identificação de possíveis estirpes brasileiras de Bt produtoras de Parasporina. Após varredura em 269 estirpes, 30 delas apresentaram resultados positivos quando testadas com iniciadores específicos para o gene de Parasporina 1, e outras 5 estirpes apresentaram resultados positivos para Parasporina 3. A expressão desses genes foi confirmada por algumas estirpes, através da análise do perfil proteico.

A estirpe S1338 possivelmente produz a proteína Parasporina 1, que após ensaio de viabilidade celular, demonstrou toxicidade específica contra a linhagem de câncer de mama MCF-7, com IC<sub>50</sub> de 14,75µg.

O extrato proteico dessa estirpe não apresentou capacidade de reduzir a migração das células de câncer de mama MCF-7, porém análises morfológicas sugerem que o tipo de morte celular envolvido com as toxinas produzidas pela estirpe S1338 provavelmente é a apoptose. Além disso, a linhagem MCF-7 não produz caspase 3, molécula fundamental no mecanismo de apoptose, sugerindo um novo modo de ação ainda desconhecido para a possível Parasporina 1 da estirpe S1338.

Dessa forma, conclui-se que a Parasporina 1 relatada neste trabalho possui características únicas, podendo muito em breve tornar-se uma biomolécula no tratamento de células tumorais, e até mesmo ser utilizada de forma sinérgica com outras moléculas anti-câncer, tendo em vista sua baixa competição com as principais drogas disponíveis no mercado para tratamento dessa doença.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Sequenciar os genes de Parasporina identificados nesse trabalho, especialmente da estirpe S1338.
- Clonar e expressar o gene *parasporina* em células de Bt, utilizando uma linhagem de Bt acristalífero.
- Identificar o possível receptor da Parasporina 1 de *B. Thuringiensis* S1338 para a linhagem MCF-7.
- Analisar o efeito da Parasporina 1 da estirpe S1338 no ciclo celular e, através de citometria de fluxo, elucidar o perfil de morte envolvido com essa toxina.
- Testar a possível atividade citotóxica da proteína ativada das estirpes positivas contra outras linhagens de células tumorais.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ABDULKAREEM, I. H.; ZURMI, I. B. Review of hormonal treatment of breast cancer. *Niger J Clin Pract*, v. 15, n. 1, p. 9-14, 2012.

AKIBA, T.; ABE, Y.; KITADA, S.; KUSAKA, Y.; ITO, A.; ICHIMATSU, T.; KATAYAMA, H.; AKAO, T.; HIGUCHI, K.; MIZUKI, E.; *ET AL.* Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *J. Mol. Biol.*, 386, 121–133, 2009.

AKIBA, T.; ABE, Y.; KITADA, S.; KUSAKA, Y.; ITO, A.; ICHIMATSU, T.; KATAYAMA, H.; AKAO, T.; HIGUCHI, K.; MIZUKI, E.; *ET AL.* Crystallization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic activity against human cells. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 60, 2355–2357, 2004.

AKIBA, T.; ABE, Y.; KITADA, S.; KUSAKA, Y.; ITO, A.; ICHIMATSU, T.; KATAYAMA, H.; AKAO, T.; HIGUCHI, K.; MIZUKI, E.; *ET AL.* Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *J. Mol. Biol.*, 386, 121–133, 2009.

AKIBA, T.; HIGUCHI, K.; MIZUKI, E.; EKINO, K.; SHIN, T.; OHBA, M.; KANAI, R.; HARATA, K. Nontoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* demonstrates a remarkable structural similarity to pore-forming toxins. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, 63, 243–248, 2006.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5<sup>th</sup> edition. New York, Garland Science. 2008.

ALI, B. A.; SALEM, H. H.; WANG, X. M.; HUANG, T. H.; XIE, Q. D.; ZHANG, X. Y. Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* endotoxin on the intermediate snail host of *Schistosoma japonicum*. *Curr. Res. Bacteriol.*, 3, 37–41, 2010.

ALLEY, M. C.; SCUDIRO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*, 48, 589-601, 1988.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2014*. Atlanta, Ga: American Cancer Society. 2014.

AMMIRANTE, M.; LUO, J. L.; GRIVENNIKOV, S.; NEDOSPASOV, S.; KARIN M. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature*, v. 464, n. 7286, p. 302-5, 2010.

ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 68, n. 3, p. 203-212, 1996.

ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no controle biológico. In: Serafini, L. A.; Barros, N. M.;

Azevedo, J. L. (Org.). Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria. Caxias do Sul: EDUSC, p. 269-293, 2002.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiology Review: 50, p. 1-24, 1986.

BANTIS, A.; GRAMMATICOS, P. Prostatic specific antigen and bone scan in the diagnosis and follow-up of prostate cancer. Can diagnostic significance of PSA be increased? Hellenic Journal of Nuclear Medicine [online], v. 15, n. 3, p. 241-246, 2012. Disponível em: <http://nuclmed.web.auth.gr/magazine/eng/sept12/index.htm>. Acesso em: 02 dez. 2014.

BARRA, G. B.; CAIXETA, M. C. S.; COSTA, P. G. G.. Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro. RBAC. 43 (3)254-60, 2011.

BEKHEIT, H. K. M.; LUCAS, A. N.; GEE, S. J.; HARRISON, R. O.; HAMMOCK, B. D. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 41, n. 9, p. 1530-1536, 1993.

BERDASCO, M.; ESTELLER, M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. Dev Cell, v. 19, n. 5, p. 698-711, 2010.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr. Opin. Plant. Biol., 4: 343-350, 2001.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis: 8, p. 93-99, 1987.

BOYED, M. R. The NCI in vitro Anticancer Drug Discovery Screen. In Anticancer Drug Development Guide; Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval. Edited by Teicher B. Totowa: Humana Press; 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 248-254, 1976.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama. Disponível em: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acesso em: 10 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama. 132 p. (Cadernos de Atenção Básica, n. 13). Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME. 6ª ed. 198p. Brasília, 2009.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, v.49, n.4, Mar 15, p.423-35, 2007.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of Cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*: 64, p. 4965 – 4972, 1998.

BRENNAN, S. M. F.; HARDY, E.; ZEFERINO, L. C.; NAMURA, I. Knowledge, attitudes, and practices related to the Pap smear among women with cervical cancer. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 909-914, ago. 2001.

BRITO, S. F. S.; MORAIS, V. Câncer de próstata: caracterização epidemiológica e riscos hereditários. *Revista Eletrônica Acervo Saúde [online]*, v. 4, n.1, p. 247-257, 2012. Disponível em: [http://acervosaud.dominiotemporario.com/doc/artigo\\_020.pdf](http://acervosaud.dominiotemporario.com/doc/artigo_020.pdf). Acesso em: 05 dez. 2014.

BURGES, H. D.; AIZAWAI, A.; DULMAGE, H. T.; DE BARJAC, H. Numbering of the H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.*, v.40, p.419, 1982.

CAMPOS, H. L. M.; DIAS, F. M. V.; MORAES, S. C.; VARGAS, S. C. Aspectos culturais que envolvem o paciente com diagnóstico de neoplasia de próstata: um estudo na comunidade. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 57, n. 4, p. 493-501, 2011.

CAPDEVILLE, R.; BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMANN, J.; MATTER, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov.*, 1(7): 493-502, 2002.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. A propósito da apoptose em LMC: estudos promissores. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* .27(2): 81-82, 2005.

CLIFFORD, G. M.; GALLUS, S.; HERRERO, R.; MUÑOZ, N.; SNIJDERS, P. J.; VACCARELLA, S.; ANH, P. T. H.; FERRECCIO, C.; HIEU, N. T.; MATOS, E.; MOLANO, M.; RAJKUMAR, R.; RONCO, G.; DE SANJOSÉ, S.; SHIN, H. R.; SUKVIRACH, S.; THOMAS, J. O.; TUNSAKUL, S.; MEIJER, C. J. L. M.; FRANCESCHI, S. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 366(9490):991-8, 2005.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, 326, 1-12, 1997.

COLE, A.R.; GIBERT, M.; POPOFF, M.; MOSS, D.S.; TITBALL, R.W.; BASAK, A.K. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 797–798, .

CORRÊA, R. F. T.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M. Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*  $\delta$ -endotoxins towards insect and mammalian cells. *Plos one*. 7 (9):e46121, 2012.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 807–813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Disponível em: [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/) Acesso em: 13 jan. 2015

CRUZ, L. M. B, LOUREIRO, R. P. A comunicação na abordagem preventiva do câncer do colo do útero: importância das influências histórico-culturais e da sexualidade feminina na adesão às campanhas. *Saúde Soc.*; 17 (2): 120-131, 2008.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, v. 150, n. 1, p. 12-27, 2012.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Mise au point sur sa classification des *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*, v.18, p.5-17, 1973.

DE BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. v.35(2), p.233-240, 1990.

DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRÖNBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, v. 7, n. 4, p. 256-69, 2007.

DUAVY, L. M.; BATISTA, F. L. R.; JORGE, M. S. B.; SANTOS, J. B. F. A percepção da mulher sobre o exame preventivo do câncer cérvico-uterino: estudo de caso. *Ciência e Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 733-742, 2007.

DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *Journal of Invertebrate Pathology*: 15, p. 232-239, 1970.

DUTT, S. S.; GAO, A. C. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. *Future Oncol*, v. 5, n. 9, p. 1403-13, 2009.

ECCLES, S. A.; BOX, C.; COURT, W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Biotechnol. Ann. Rev.* 2005, 11, 391–421.

ECK-ENRIQUEZ, K.; KIEFER, T. L.; SPRIGGS, L. L.; HILL, S. M. Pathways through which a regimen of melatonin and retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 61, 229-239, 2000.

EISENBERG, ALA.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). *Rev Bras Cancerol.*, 17(4):377-88, 2001.

EKINO, K.; OKUMURA, S.; ISHIKAWA, T.; KITADA, S.; SAITOH, H.; AKAO, T.; OKA, T.; NOMURA, Y.; OHBA, M.; SHIN, T.; MIZUKI, E. Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain. *Toxins*, 2014.



- EL BAROUKI, M. P. Rastreamento do câncer de próstata em homens acima de 50 anos através do exame diagnóstico de PSA. *Revista Eletrônica Gestão & Saúde*, v. 3, n. 2, p. 704-716, 2012.
- ELUF NETO, J. A vacina contra o papilomavírus humano. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. São Paulo, v. 11 n. 3, p. 505-525, set. 2008.
- ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, v. 8, n. 4, p. 286-98, 2007.
- FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, v. 301, n. 5895, p. 89-92, 1983.
- FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. *Biotechnol.* 10, 271-275, 1992.
- FENG, S. S.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chem Eng Sci*, v. 58, p. 4087-4114, 2003.
- FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, v. 127, n. 12, p. 2893-917, 2010
- FINNEY, D. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1971.
- FISCHHOFF, D. A. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology*: 5, p. 807-813, 1987.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis. *Annual review of medicine*, v. 57, p. 1-18, 2006.
- FRASER, A. & EVAN, G. A license to kill. *Cell*, 85, 781-784, 1996.
- FRIEDL, P.; BROEKER, E. B. The biology of cell locomotion within 3-dimensional extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57, 41-64, 2000.
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumor-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 362-374, 2003.
- GABRIOTTI, L. F. B. Apresentação atípica de adenocarcinoma prostático: Relato de caso. *Arquivos de Ciência da Saúde*, v. 18, n. 4, 2011.
- GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 584 - 592, 2001.
- GEY, G. O., COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-265, 1952.
- GLARE, T. R. & O'CALLAGHAM, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley and Sons, 350 p., 2000

GLOBOCAN 2012: Breast Cancer: estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Lyon, France: IARC.

Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) Acesso em: 21 dec. 2014.

GOELZ, S. E.; VOGELSTEIN, B.; HAMILTON, S. R.; FEINBERG, A. P. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*, v. 228, n. 4696, p. 187-90, 1985.

GOMES, R.; REBELLO, E. F. S.; DE ARAÚJO, F. C.; NASCIMENTO, E. F.. Prostate cancer prevention: a review of the literature. *Cien Saude Colet*, v. 13, n. 1, p. 235-46, 2008.

GONZALEZ, E.; GRANADOS, J. C.; SHORT, J. D.; AMMONS, D. R.; RAMPERSAD, J. Parasporins from a Caribbean Island: Evidence for a Globally Dispersed *Bacillus thuringiensis* Strain. *Curr Microbiol*. 62:1643-1648, 2011.

GRAHAM-EVANS, B.; TCHOUNWOU, P. B.; COHLY, H. H. Cytotoxicity and proliferation studies with arsenic in established human cell lines: keratinocytes, melanocytes, dendritic cells, dermal fibroblasts, microvascular endothelial cells, monocytes and T- cells. *Int. J. Mol. Sci*. 4: 13-21, 2003.

GUEX, N.; PEITSCH, M.C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30, 162–173, 2009.

GUINEBRETIERE, M. H.; THOMPSON, F. L.; SOROKIN, A.; NORMAND, P.; DAWYNDT, P.; EHLING-SCHULZ, M.; SVENSSON, B.; SANCHIS, V.; NGUYEN-THE, C.; HEYNDRICKX, M.; DE VOS, P. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*, v. 10, n. 4, p. 851-865, 2008.

HABIB, M. E. M. & ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: Controle microbiano de insetos. Ed. Alves, S.B., FEALQ, Piracicaba, p. 383-446, 1998.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat rev Cancer*. 2 (5): 331-341, 2002.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer. *Cell*. , Vol. 100: 57–70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v.144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: Entomopat. Bact.: from laboratory to field application, Kluwer Academic Publishers, p.41-44, 2000.

HARBECK, N. Breast cancer: Increasing therapy options for HER2-positive early breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, v. 9, n. 1, p. 10-12, 2011.

HARRIS, C. C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res*. 51(18 Suppl):5023s-5044s, 1991.

- HARRIS, W. P.; MOSTAGHEL, E. A.; NELSON, P. S.; MONTGOMERY, B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol*, v. 6, n. 2, p. 76-85, 2009.
- HASTOWO, S.; LAY, B. W.; OHBA, M. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *J Appl Microbiol* 73: 108-113, 1992.
- HELGASON, E.; OKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A.; FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I.; KOLSTØ, A. B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*: One species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.
- HIROHASHI, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*. 153(2):333-9, 1998.
- HOFFMAN, R. M., Screening for Prostate Cancer, *The New England Journal of Medicine*, v. 365, p. 2013-2019, 2011.
- HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HOFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 7844–7848, 1988.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53, 242–255, 1989.
- HORWITZ, R.; WEBB, D. Cell migration. *Curr. Biol.*, 13, R756–R759, 2003.
- HOU, D. X.; TONG, X.; TERAHARA, N.; LUO, D.; FUJII, M. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 440, 101–109, 2005.
- IBARGUTXI, M. A.; ESTELA, A.; FERRE, J.; CABALLERO, P. Use of *Bacillus thuringiensis* Toxins for Control of the Cotton Pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 1, p. 437–442, 2006.
- INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> Acesso em: 12 dez. 2014.
- ITO, A.; SASAGURI, Y.; KITADA, S.; KUSAKA, Y.; KUWANO, K.; MASUTOMI, K.; MIZUKI, E.; AKAO, T.; OHBA, M. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *J. Biol. Chem.*, 279, 21282–21286, 2004.
- JANICKE, R. U.; SPRENGART, M. L.; WATI, M. R.; PORTER, A. G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 273: 9357–9360, 1998.
- JÄNNE, PASI A.; GRAY, NATHANAEL; SETTLEMAN, JEFF. "Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors". *Nature Reviews Drug Discovery* 8 (9): 709–23, 2009.

- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.
- JONES, G. W.; NIELSEN-LEROUX C., YANG Y., YUAN Z.; DUMAS V. F.; MONNERAT, R. G.; BERRY. C. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. *FASEB J*. 21:4112-4120, 2007.
- JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. *Cell*, v. 128, n. 4, p. 683-92, 2007.
- JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*: 131, p. 1-11, 1998.
- KATAYAMA, H.; KUSAKA, Y.; MIZUK, E. Parasporin-1 Receptor and Use Thereof. U.S. Patent 20110038880, filed 30 March 2009, and issued 17 February 2011.
- KATAYAMA, H.; KUSAKA, Y.; YOKOTA, H.; AKAO, T.; KOJIMA, M.; NAKAMURA, O.; MEKADA, E.; MIZUKI, E. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca<sup>2+</sup> influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in toxin-sensitive cells. *J Biol Chem* 282: 7742-7752, 2007.
- KATAYAMA, H.; YOKOTA, H.; AKAO, T.; NAKAMURA, O.; OHBA, M.; MEKADA, E.; MIZUKI, E. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biochem.*, 137, 17–25, 2005.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26:239-257, 1972.
- KIM, L. Advanced Engineered Pesticides: Technology and Engineering. New York: Marcel Dekker Inc., 448 p., 1993.
- KITADA, S.; ABE, Y.; MAEDA, T.; SHIMADA, H. Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. *Toxicology*, 264, 80–88, 2009.
- KITADA, S.; ABE, Y.; SHIMADA, H.; KUSAKA, Y.; MATSUO, Y.; KATAYAMA, H.; OKUMURA, S.; AKAO, T.; MIZUKI, E.; KUGE, O.; SASAGURI, Y.; OHBA, M.; ITO, A. Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 281, 26350–26360, 2006.
- KNAPP, O.; MAIER, E.; BENZ, R.; GENY, B.; POPOFF, M.R. Identification of the channel-forming domain of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin (ETX). *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 1788, 2584–2593, 2009.
- KNAPP, O.; STILES, B.G.; POPOFF, M.R. The aerolysin-like toxin family of cytolytic, pore-forming toxins. *Open Toxicol. J.*, 3, 53–68, 2010.
- KNOWLES, B. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* 24, 275–308, 1994.

- KNOWLES, B.H.; DOW, J. A. T. The Crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*, v.15, p. 469-476, 1993.
- KOLSTO, A. B.; TOURASSE, N. J.; OKSTAD, O. A. What Sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* Species? *Annual Review of Microbiology*, v. 63, p. 451-476, 2009.
- KRYWUNCZYK, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 36, p. 139-140, 1980.
- KWA, M. S. G.; MAAGD, R. A.; STIEKEMA, W. J.; VLAK, J. M.; BOSCH, D. Toxicity and Binding Properties of the *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1C to Cultured Insect Cells. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 71, p. 121-127, 1998.
- LAEMMLI, U. K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage. T4. *J Mol Biol*, v.80, p.575-599, 1973.
- LECADET, M. M.; FRANCHON, E.; COSMAO, D. V.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P.; THIÉRY, I. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 86, p. 660-672, 1999.
- LEE, B. L.; LIEDKE, P. E. R.; BARRIOS, C. H.; SIMON, S. D.; FINKELSTEIN, D. M.; GOSS, P. E. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. *Lancet Oncol*, v. 13, n. 3, p. e95-e102, 2012.
- LEE, D. H.; CHA, I. H.; WOO, D. S.; OHBA, M. Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis*: fecal populations recovered from wildlife in Korea. *Can J Microbiol* 49: 465-471, 2003.
- LERECLUS, D.; ARANTÈS, O. CHAUF AUX, J.; LECAD ET, M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 60, n. 2, p. 211-218, 1989.
- LERECLUS, D.; DELECLUSES, A.; LECAD ET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, p. 37-70. In Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. (eds) *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. West Sussex, John Willey & Sons, p. 330, 1993.
- LI, F.; SUN, J.; ZHU, H.; WEN, X.; LIN, C.; SHI, D. Preparation and characterization novel polymer-coated magnetic nanoparticles as carriers for doxorubicin. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 88, n. 1, p. 58-62, 2011.
- LIANG, X. H.; JACKSON, S.; SEAMAN, M.; BROWN, K.; KEMPKES, B.; HIBSHOOSH, H.; LEVINE, B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402, 672-676, 1999.
- LOEB, L. A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 51 (12):3075-9, 1991.

LORENCE, A.; DARSON, A.; DÍAZ, C.; LIÉVANO, A.; QUINTERO, R.; BRAVO, A.  $\delta$ -endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. FEBS Lett. 360, 217–222, 1995.

LUTHY, P.; WOLFERSBERG, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxin. In Charles J. F., Delecluse A., Nielsen-Le Roux, C. (Eds.) Entomopathogenic bacteria from laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers, p. 167-180, 2000.

LYSENKO, O. *Bacillus thuringiensis*: evolution of a taxonomic conception. Journal of Invertebrate Pathology, v. 42, n. 3, p. 295-298, 1983.

MAC INNES, T. C. & BOUWER, G. An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. Journal of Invertebrate Pathology, v. 101, n. 2, 2009.

MAEDA, M.; MIZUKI, E.; NAKAMURA, Y.; HATANO, T.; OHBA, M. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. Curr Microbiol 40: 418-422, 2000.

MALAS ORUÇ, O.; CAQLAYAN, B.; OCAL, Z.; OZKAN, A.; TORUN, E.; MAYADAQLI, A. Evaluation of pulmonary complications of radiotherapy in breast cancer patients. J BUON, v. 9, n. 4, p. 409-415, 2004.

MARIOTTO, A. B.; YABROFF, K. R.; SHAO, Y.; FEUER, E. J.; BROWN, M. L. Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. Journal of the National Cancer Institute, v. 103, n. 2, p. 117–28, 2011.

MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. S. Treatment of breast cancer. Am Fam Physician, v. 81, n. 11, p. 1339-1346, 2010.

MEDEIROS, P. T.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G.; SOUZA, N. R. Instalação e manutenção de criação massal da traça-dascrucíferas (*Plutella xylostella*). Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 29), 2003.

MELTON, J.A.; PARKER, M.W.; ROSSJOHN, J.; BUCKLEY, J.T.; TWETEN, R.K. The identification and structure of the membrane-spanning domain of the *Clostridium septicum*  $\alpha$ -toxin. J. Biol. Chem., 279, 14315–14322, 2004.

MINAMOTO, T.; MAI, M.; RONAI, Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. Carcinogenesis. 20(4):519-27, 1999.

MIRALLES, M. P. & PERES, V. J. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*, p.207-232 In Bravo, A.; Ceron, J. (eds) *Bacillus thuringiensis* em el control biológico. Bogotá, Colombia, p. 293, 2004.

MIZUKI, E.; OHBA, M.; AKAO, T.; YAMASHITA, S.; SAITOH, H. PARK, Y. S. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. J Appl Microbiol 86: 477-486, 1999.

MIZUKI, E.; PARK, Y. S.; SAITOH, H.; YAMASHITA, S.; AKAO, T.; HIGUCHI, K.; OHBA, M. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:625–634, 2000.

MOISSOGLU, K.; & SCHWARTZ, M. A. Integrin signalling in directed cell migration. *Biol. Cel* .98: 547 – 555, 2006.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Controle Biológico, eds. Melo, I.S., Azevedo, J.L., Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p.163-200, 2000.

MONNERAT, R. G. & PRAÇA, L. B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: Oliveira-Filho, E. C.; Monnerat, R. G. Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 352p. 2006.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F. da; SILVA WERNECK, J. O. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 65 (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 60), 2001.

MONNERAT, R.; DIAS, D. S.; SILVA, S.F. DA; MARTINS, E. S.; BERRY, C.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M.; PRAÇA, L. B.; SOARES, C. M. S. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, p. 103-1006, 2005.

MONNERAT, R.; MASSON L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAI-CAREY, M.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Current Microbiology*, v. 39, p. 159–162, 1999.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C.; FALCÃO, R.; SILVA-WERNERCK, J. O.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, v. 41, p. 291– 295, 2007.

MOOLGAVKAR, S. H.; KNUDSON, A. G. JR. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.*; 66(6):1037-52, 1981.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Vacinas contra o Papilomavirus humano. *Revista Brasileira de Colo-proctologia*, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 337-340, 2006.

NAGAMATSU, Y.; OKAMURA, S.; SAITOU, H.; AKAO, T.; MIZUKI, E. 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, 494–498, 2010.

NASCIMENTO, E. P.; FLORINDO, A. A.; CHUBACI, R. Y. S. Exame de detecção precoce do câncer de próstata na terceira idade: conhecendo os motivos que levam ou não a sua realização. *Revista Baiana de Saúde Pública*, Bahia, v. 34, n. 1, p. 7-18, 2010.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. GenBank. Nucleic Acids Res. 2013 Jan;41(Database issue):D36-42.  
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html> Acesso em : 10 mar. 2013.

NELSON, W. G.; ANGELO M. DE MARZO, A. M. M.; ISAACS, W. B., Mechanisms of disease Prostate Cancer, New England Journal Of Medicine, v. 349, p. 366-381, 2003.

NILSSON, G.; HOLMBERG, L.; GARMO, H.; DUVERNOY, O.; SJÖGREN, I.; LAQERQVIST, B.; BLOMQVIST, C. Distribution of coronary artery stenosis after radiation for breast cancer. J Clin Oncol, v. 30, n.4, p. 380-386, 2011.

OBERHAMMER, F.; WILSON, J. W.; DIVE, C.; MORRIS, I. D.; HICKMAN, J. A.; WAKELING, A. E.; WALKER, P. R.; SIKORSKA, M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. EMBO J., 12, 3679-3684, 1993.

OHBA, M. *Bacillus thuringiensis* diversity in soil and phylloplane. In: Logan NA, De Vos P (eds) Endospore-forming soil bacteria, soil biology, vol 27. Springer, Berlin, pp 215–233, 2011.

OHBA, M. *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. J Appl Bacteriol 80: 56-64, 1996.

OHBA, M.; AIZAWA, K. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. J Invertebr Pathol 47: 12-20, 1986.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Research, 29: 427–433, 2009.

OHBA, M.; TSUCHIYAMA, A.; SHISA, N.; NAKASHIMA, K.; LEE, D. H.; OHGUSHI, A.; WASANO, N. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in oceanic islands of Japan, Daito-shoto and Ogasawara-shoto. Appl Entomol Zool 37: 477-480, 2002.

OHBA, M.; WASANO, N.; MIZUKI, E. *Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occurring in the Ryukyus, a subtropic region of Japan. Microbiol Res 155: 17-22, 2000.

OKUMURA, S., OHBA, M.; MIZUKI, E.; CRICKMORER, N.; CÔTÉ, J. C.; NAGAMATSU, Y., KITADA S.; SAKAI, H.; HARATA, K.; SHIN, T. “Parasporin nomenclature”. Disponível em: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>. Acesso em: 13 jan 2015.

OKUMURA, S.; SAITOH, H.; ISHIKAWA, T.; INOUE, K.; MIZUKI, E. Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. Biochim. Biophys. Acta., 1808, 1476–1482, 2011.



OKUMURA, S.; SAITOH, H.; ISHIKAWA, T.; MIZUKI, E.; INOUE, K. Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 14, 225–252, 2008.

OLIVEIRA, M. M. A prevenção do câncer de colo de útero no contexto da Estratégia Saúde da Família, da Área Básica da Distrital Oeste/Sumarezinho, no município de Ribeirão Preto [Dissertação]. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2003.

OMS. Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of diseases vectors. UNDP: World Bank: Who. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, TDR/BCV/IC-GE/87.3. 41 p., 1987.

OTTLEY, E.; GOLD, E., Insensitivity to the growth inhibitory effects of activin A: An acquired capability in prostate cancer progression, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, p. 1-7, 2012.

PAIVA, E. P.; MOTTA, M. C. S.; GRIEP, R. H. Barriers related to screening examinations for prostate cancer. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, Ribeirão Preto, v. 19, n. 1, p. 73-80, 2011.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview Of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6, 3296-3325, 2014.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2013.

PATH. Preventing cervical cancer in low-resource settings. *Path's Outlook* [on line], v. 18, n. 1, p. 1-8. 2000.  
Disponível em: [http://www.reproline.jhu.edu/english/3cc/3outlook/outlook\\_cc2.htm](http://www.reproline.jhu.edu/english/3cc/3outlook/outlook_cc2.htm)  
Acesso em: 03 out. 2014

PAYNE, C.M.; BOMBLE, Y.J.; TAYLOR, C.B.; MCCABE, C.; HIMMEL, M.E.; CROWLEY, M.F.; BECKHAM, G.T. Multiple functions of aromatic-carbohydrate interactions in a processive cellulase examined with molecular simulation. *J. Biol. Chem.*, 286, 41028–42035, 2011.

PEGRAM, M.; LIAO, J. Trastuzumab treatment in multiple lines: current data and future directions. *Clin Breast Cancer*, v. 12, n. 1, p. 10-18, 2012.

PEROU, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The oncologist*, v. 16 Suppl 1, p. 61–70, 2011.

PIERCE, L. J. The use of radiotherapy after mastectomy: a review of the literature. *J Clin Oncol*, v. 23, n. 8, p. 1706-1717, 2005.

PIGOTT, C. R. & ELLAR D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71, n. 2, p. 255–281, 2007.

PINHO, A. A.; FRANÇA JÚNIOR I. Prevenção do câncer de colo do útero: um modelo teórico para analisar o acesso e a utilização do teste de Papanicolaou. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.*; 3(1): 95 -112, 2003.

POLANCZYK, R. & ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. *Agrociência*. v. 2, n. 2, p. 1-10, 2003.

PRENEN, H.; TEIPAR, S.; VAN CUTSEM, E.; New strategies for treatment of KRAS mutant metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.*, 1;16 (11):2921-6, 2010.

PUHALLA, S.; BHATTACHARYA, S.; DAVIDSON, N. E. Hormonal therapy in breast cancer: A model disease for the personalization of cancer care. *Mol Oncol*, v. 6, n. 2, p. 222-236, 2012.

PURUSHOTHAM, A. D.; LEWISON, G.; SULLIVAN, R. The state of research and development in global cancer surgery. *Ann Surg*, v. 255, n. 3, p. 427-432, 2012.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R. Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.10, p.6276-6281, 2005.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P.R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen? *Trends Microbiol.*, 18, 189–194, 2010.

REED, J. C. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 17(9):2941- 53, 1999.

RICKE, E. A.; WILLIAMS, K; LEE, Y. F.; COUTO, S.; WANG, Y.; HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R.; RICKE, W. A. Androgen hormone action in prostatic carcinogenesis: stromal androgen receptors mediate prostate cancer progression, malignant transformation and metastasis. *Carcinogenesis*, v. 33, n. 7, p. 1391-8, 2012.

RIDLEY, A. J.; SCHWARTZ, M. A.; BURRIDGE, K.; FIRTEL, R. A.; GINSBERG, M. H.; BORISY, G.; PARSONS, G. T.; HORWITZ, A. R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* .302: 1704 – 1709, 2003.

ROBERTSON, J. R.; PREISLER, H. K.; RUSSELL, R. M. Polo Plus. Probit and logit analysis user's guide. LeOra Software, Petaluna, CA. 2002.

ROH, J.Y.; CHOI, J.Y.; LI, M.S.; JIN, B.R.; JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Mol. Biol.*, 17, 547–559, 2007.

ROMER, L. H.; BIRUKOV, K. G.; GARCIA, J. G. Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. *Circ. Res.* 98: 606 – 616, 2006.

ROUS, S. N. Guia completo da próstata: informação médica sobre sintomas e tratamento. 1 ed. São Paulo: Gaia, 2010.

RUITERKAMPP, J.; ERNST, M. F. The role of surgery in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*, v. 47, n. 3, p. S6-S22, 2011.

- SAITOH, H.; HIGUCHI, K.; MIZUKI, E.; OHBA, M. Larvicidal toxicity of Japanese *Bacillus thuringiensis* against the mosquito *Anopheles stephensi*. *Med. Vet. Entomol.* 12:98–102., 1998
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- SANTOS, A. C. F.; SILVA, E. M.; PACHECO, J. B. P. Avaliação da primeira campanha para o diagnóstico e prevenção do câncer de próstata promovido pela prefeitura municipal de Anápolis – GO. *Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente [online]*, v. 13, n. 17, p. 25-42, 2010.
- SARAIVA, M.; PRAÇA, L. B.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. Isolamento de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* para o controle de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. Comunicado técnico 164. Embrapa. Brasília, DF. 2007.
- SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. Metodologia de criação de insetos para a avaliação de agentes entomopatogênicos. Circular Técnica: 11, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 6 p, 2001.
- SCHNEIDER, U.; SUMILA, M.; ROBOTKA, J.; GRUBER, G.; MACK, A.; BESSERER, J. Dose-response relationship for breast cancer induction at radiotherapy dose. *Radiat Oncol*, v. 8, n. 6, p.67-74, 2011.
- SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, p.775-806, 1998.
- SCHWARTZ, R.; ISTRAIL, S.; KING, J. Frequencies of amino acid strings in globular protein sequences indicate suppression of blocks of consecutive hydrophobic residues. *Protein Sci.*, 10, 1023–1031, 2001.
- SFANOS, K. S.; DE MARZO, A. M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*, v. 60, n. 1, p. 199-215, 2012.
- SHEN, M. M.; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development*, v. 24, n. 18, p. 1967-2000, 2010.
- SKLOOT R. *The Immortal Life of Henrietta Lacks*. MacMillan, New York, 2010.
- SLAMON, D. J.; CLARK, G. M.; WONG, S. G.; LEVIN, W. J.; ULRICH, A.; MCGUIRE, W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, v. 235, n. 4785, p. 177–82, 1987.
- SOBERON, M. & BRAVO, A. Generalidades sobre *Bacillus thuringiensis*. In: *Metodologias utilizadas em investigación sobre bacterias entomopatógenas*. Cidade do México: CYTED, 2001.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. *Diretrizes de câncer de próstata*. Rio de Janeiro, 92p, 2011.

SRINIVASULA, S.; FERNANDES-ALNEMRI, M.; ZANGRILLIA, T.; ROBERTSON, J.; ARMSTRONG N.; WANG, R. C.; TRAPANI, L.; TOMASELLI, J. A. The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J. Biol. Chem.*, 271, 27099-27106, 1996.

SROUGI, M. Doenças da próstata. *Revista de Medicina, São Paulo*, v. 87, n. 3, p. 166-177, 2008.

STEHMAN FB, ROSE PG, GREER BE. Innovations in the treatment of invasive cervical cancer. *Cancer suppl.* 98(9):2052-2063, 2003.

STUCKEY, A. Breast cancer: epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol*, v. 54, n. 1, p. 96-102, 2011.

TAILOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Molecular Microbiology, Oxford*, v. 6, n. 9, p. 1211-1217, 1992.

TANAKA, T.; DECUZZI, P.; CRISTOFANILLI, M.; SAKAMOTO, J. H.; TASCIOTTI, E.; ROBERTSON, F. M.; FERRARI, M. Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomed Microdevices*, v. 11, p. 49-63, 2009.

TONANI, M.; CARVALHO, E. C. Risco de câncer e comportamentos preventivos: a persuasão como estratégia de intervenção. *Rev Latinoam Enferm. Set-Out*; 16(5):67-74, 2008.

TRUFELLI, D. A.; MIRANDA, V. C.; DOS SANTOS, M. B. B.; FRAILE, N. M. P.; PECORONI, P. G.; GONZAGA, S. F. R.; RIECHELMANN, R.; KALIKS, R.; DEL GIGLIO, A.; Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. *Rev Assoc Med Bras.* 54(1): 72-6, 2008.

UCSD, University of California, San Diego. *Bacillus thuringiensis*, History of Bt. Disponível em: [http://www.bt.uscd.edu/bt\\_history.html](http://www.bt.uscd.edu/bt_history.html). Acesso em: 07 nov. 2014.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 *Nucleic Acids Research* 35: W71-W74, 2007.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.*, 101, 1–16, 2009.

VAN'T VEER, L. J. VAN; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y. D.; HART, A. A.; MAO, M.; PETERSE, H. L.; VAN DER KOOY, K.; MARTON, M. J.; WITTEVEEN, A. T.; SCHREIBER, G. J.; KERKHOVEN, R. M.; ROBERTS, C.; LINSLEY, P. S.; BERNARDS, R.; FRIEND, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, v. 415, n. 6871, p. 530– 6, 2002.

VICENTE-MANZANARES, M.; WEBB, D. J.; HORWITZ, A. R. Cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* 118: 4917 – 4919, 2005.

VIEIRA, D. S. C.; DUFLOTH, R. M.; SCHMITT, F. C. L.; ZEFERINO, L. C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Rev Bras Ginecol Ostet. Out*; 30(1):42-7, 2008.

WACHOLDER, S.; HARTGE, P.; PRENTICE, R.; GARCIA-CLOSAS, M.; FEIGELSON, H. S.; DIVER, W. R.; THUN, M. J., COX, D. G.; HANKINSON, S. E.; KRAFT, P.; ROSNER, B.; BERG, C. D.; BRINTON, L. A.; LISSOWSKA, J.; SHERMAN, M. E.; CHLEBOWSKI, R. KOOPERBERG, C.; JACKSON, R. D.; BUCKMAN, D. W.; HUI, P.; PFEIFFER, R.; JACOBS, K. B.; THOMAS, G. D.; HOOVER, R. N.; GAIL, M. H.; CHANOCK, S. J.; HUNTER, D. J. Performance of common genetic variants in breast cancer risk models. *N Engl J Med.* 18;362(11):986-93, 2010.

WARD, E. S. & ELLAR, D. J. Assignment of the delta -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis to a specific plasmid by curing analysis. *FEBS Letters*: 158, p. 45-49, 1983.

WEBB, D. J.; BROWN. C. M.; HORWITZ, A. F. Illuminating adhesion complexes in migrating cells: moving toward a bright future. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 614 – 620, 2003.

WEINBERG, R. A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49(14):3713-21, 1989.

WEISIER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: KRIEG, A.; HUGER, A. M.. *Mitteilungen aus der biologischen bundesanstalt für land und forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft.* Berlin: Paul Parey: 233, p. 37-50, 1986.

WHITELEY, H. R. & SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology*: 40, p. 549-576, 1986.

WHO, World Health Organization. Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 09 jan. 2015.

WHO. Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use. WHO Document WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.2. World Health Organization, Geneva, 1999.

WILT, T. J.; AHMED, H. U. Prostate cancer screening and the management of clinically localized disease. *BMJ*, v. 346, p. f325, 2013.

WIRAWAN, E.; LIPPENS, S.; VANDEN BERGHE, T.; ROMAGNOLI, A.; FIMIA, G.M.; PIACENTINI, M.; VANDENABEELE, P. BECLIN1: A role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy*, 8, 6–17, 2012.

WONG, S. Y. R. A study on the cytotoxic effect of *Bacillus thuringiensis* 18 toxin on a leukaemic cell line (CEM-SS). Thesis submitted to the International Medical University, Malaysia, 2009.

XU, C.; WANG, B.; YU, Z.; SUN, M. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin toxins. *Toxins*, 6, 2732-2770, 2014.

YAMASHITA, S.; KATAYAMA, H.; SAITOH, H.; AKAO, T.; PARK, Y.S.; MIZUKI, E.; OHBA, M.; 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.

YASUTAKE, K.; BINH, N. D.; KAGOSHIMA, K.; UEMORI, A.; OHGUSHI, A.; MAEDA, M.; MIZUKI, E.; YU, Y. M.; OHBA, M. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can J Microbiol* 52: 365-372, 2006.

YASUTAKE, K.; BINH, N. D.; KAGOSHIMA, K.; UEMORI, A.; OHGUSHI, A.; MAEDA, M.; MIZUKI, E.; YU, Y. M.; OHBA, M. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can J Microbiol* 52: 365-372, 2006.

YASUTAKE, K.; UEMORI, A.; KAGOSHIMA, K.; OHBA, M. Serological identification and insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from the island Okinoerabu-jima, Japan. *Appl Entomol Zool* 42: 285-290, 2007.

ZHANG, J.; YANG, P. L.; GRAY, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer.*, 9(1): 28-39, 2009.

ZINGG, J. M.; JONES, P. A.; Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 18(5):869-82, 1997.