



LUCIANA DE OLIVEIRA

FATOR CITOTÓXICO VACUOLIZANTE (VCF) PRODUZIDO POR
Aeromonas veronii biovar sóbria INIBE O CRESCIMENTO DE
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LUCIANA DE OLIVEIRA

FATOR CITOTÓXICO VACUOLIZANTE (VCF) PRODUZIDO POR
Aeromonas veronii biovar sobria INIBE O CRESCIMENTO DE
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. TOMOMASA YANO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR LUCIANA DE OLIVEIRA, E ORIENTADO PELO PROF. DR. TOMOMASA YANO.


Assinatura do Orientador
Departamento de Microbiologia e Imunologia
13081-900 - Campinas

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

OL4f Oliveira, Luciana, 1982-
Fator citotóxico vacuolizante (VCF) produzido por *Aeromonas veronii biovar sóbria* inibe o crescimento de células tumorais humanas / Luciana de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Tomomasa Yano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citotoxinas. 2. Vacúolos. 3. Aeromonas. I. Yano, Tomomasa, 1941-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Fator citotóxico vacuolizante (VCF) produzido por *Aeromonas veronii biovar sóbria* inibe crescimento de células tumorais humanas

Palavras-chave em inglês:

Cytotoxins

Vacuoles

Aeromonas

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Tomomasa Yano [Orientador]

Carlos Emilio Levy

Gerson Nakazato

Data de defesa: 17-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

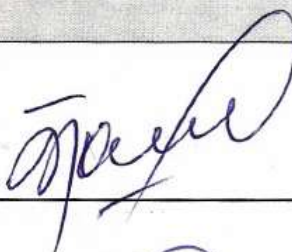
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LUCIANA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. TOMOMASA YANO

MEMBROS:

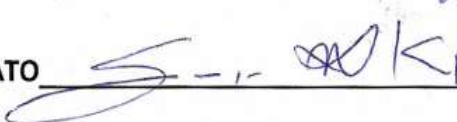
1. PROF. DR. TOMOMASA YANO



2. PROF. DR. CARLOS EMILIO LEVY



3. PROF. DR. GERSON NAKAZATO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17 de janeiro de 2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela força, amparo e principalmente por me dar sabedoria nos momentos mais difíceis.

A minha família, principalmente a minha mãe Anézia que sempre me deu muito apoio, carinho e que é meu exemplo de determinação, fé e persistência. Meu pai João, meus irmãos Wladimir, Félix e Gerson que sempre me apoiaram.

Aos todos meus amigos em especial Julio Cesar, Juliana, Antonia e Douglas que sempre me ouviram e me deram muito apoio e incentivo.

As minhas amigas de república Larissa, Germana, Talitha, Milene, Izabela, Priscila, Gabriela, Bianca. Pelo companheirismo, pela paciência e principalmente pela amizade.

Ao Prof Dr. Tomomasa Yano pela oportunidade e orientação na realização deste trabalho.

Aos professores, Dr. Hernandes, Dr. Paulo Juazeiro e seus alunos, por disponibilizarem seu tempo e seus laboratórios.

A minha amiga Cátia, pelos seus conselhos e principalmente pela sua ajuda.

Aos colegas de laboratório, Robert, Cláudia, Natália, Rogério, Luciano, Claudio, Mayara, Luis Henrique, Kris, Juliana. Pelos momentos de alegria e pela ajuda na realização deste trabalho.

A querida Stella Menegon Degrossili, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelas orientações, pelos conselhos e principalmente pela amizade.

Ao Paulinho do Laboratório de Química de Proteínas pela ajuda e disponibilidade em ajudar.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

Aeromonas são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores, oxidase e catalase positivos, ubíquos em ambientes aquáticos e capazes de causar uma variedade de doenças em humanos, principalmente gastroenterite. As espécies mais comumente associadas com infecções em humanos são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria*. Entre os vários fatores de virulência descritos, Aerolisina é considerada um dos principais fatores de virulência do genero *Aeromonas*, sendo esta além de provocar a lise em eritrócitos de carneiro tem atividade enterotóxica. Recentemente foi descrito pelo nosso uma enterotoxina citotóxica denominada Fator Citotóxico Vacuolizante (VCF), diferente de Aerolisina biológica e molecularmente, no sobrenadante da cultura de *Aeromonas veronii* biovar *sobria*, isoladas de casos clínicos. O VCF purificado apresentou atividade citotóxica em linhagens de células tumorais humanas tais como, HEP-2, Caco-2, HeLa e NCI-H 292. No ensaio de efeito anti-proliferativo o VCF apresentou potencial atividade de inibição de crescimento de células tumorais NCI-ADR/RES, uma linhagem celular com resistência a múltiplas drogas de quimioterapia e K562, uma linhagem de células leucêmicas. Estes resultados sugerem que o VCF apresenta potencial toxigênico sobre células tumorais de origem humana.

ABSTRACT

Aeromonas is a Gram-negative, facultative anaerobic rod, fermenting, oxidase and catalase positive ubiquitous in fresh and brackish water and capable of causing several human diseases, specially gastroenteritis. The most important pathogens species associated with human infections are *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii biovar sobria*. Between the several virulence factors described, Aerolisin is considered as one of the main virulence factors of the *Aeromonas* genus, this one causing lysis in lamb erythrocytes and has an enterotoxic activity. Was recently described by our a citotoxic enterotoxin named as Vacuolating Cytotoxic Factor (VCF), differing biologically and molecularly from the Aerolisin, at the supernatant of a culture of *A. veronii biovar sobria*, isolated from clinic cases. The purified VCF presented citotoxic activity on lineages of human tumorous cells such as , HEp-2, Caco-2, HeLa and NCI-H 292. On the test antiproliferative effect the VCF presented a potencial activity of growth inhibition on tumour cells NCI-ADR/RES, a cellular lineage with resistance to multiple chemotherapy drugs and K562, a lineage of leukemic cells. This results suggests that the VCF presents toxigenic potencial over human tumorous cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

VCF	Fator citotóxico vacuolizante
MDR	Resistência a múltiplas drogas
TSB	Caldo de soja tripticase
IMAC	Cromatografia de afinidade por íon metálico
PBS	Tampão de fosfato salina
HEC-1-B	Célula de Adenocarcinoma de endométrio uterino
NCI-H292	Célula de carcinoma pulmonar humano
Caco-2	Célula de Adenocarcinoma de colo retal humano
HeLa	Célula de adenocarcinoma cervical humano
HEp-2	Célula de carcinoma de laringe humano
UACC-62	Célula de melanoma
MCF-7	Célula mama humano
NCI-ADR/RES	Célula de ovário resistente a múltiplas drogas humano
786-0	Célula rim humano
NCI-H460	Célula pulmão humano
PC-3	Célula próstata humano
OVCAR-3	Célula ovário humano
HT-29	Célula colón humano
K562	Célula de leucemia humano
CHO	Célula de ovário de hamster chinês
Vero	Célula de rim de macaco verde africano
MEM	Meio essencial mínimo de Eagle
RPMI	Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado
HE	Hematoxilina-eosina

LISTA DE FIGURAS

Figura-1A.Eletroforese Bi-dimensional (2D)	21
Figura-1B.Perfil cromatográfico.....	21
Figura-2.Ação tóxica do VCF sobre linhagens de células tumorais humanas	22
Figura-3. Efeito anti-proliferativo do VCF em diferentes células tumorais humana	22

SUMÁRIO

1.Introdução.....	12
2.Objetivos gerais.....	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. Materiais e métodos.....	18
3.1. Amostra bacteriana e extrato bruto.....	18
3.2. Purificação do VCF.....	18
3.3. Determinação do ponto isoelétrico através de eletroforese 2D.....	18
3.4.Atividade citotóxica do VCF.....	19
3.4.1.Cultura celular.....	19
3.4.2.Ensaio de atividade citotóxica do VCF.....	19
3.4.3.Ensaio de efeito anti-proliferativo do VCF.....	20
4.Resultados.....	21
4.1. Purificação do VCF.....	21
4.2. Ação tóxica do VCF sobre linhagens de células tumorais humanas.....	21
4.3.Efeito anti-proliferativo do VCF em diferentes células tumorais humanas.....	22
5.Discussão.....	25
6.Conclusões.....	28
7. Referências Bibliográficas.....	29
8.Apêndices.....	37
8.1 Artigo submetido.....	37
8.1.1Apêndice 1- Artigo submetido à revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research.....	37

1. INTRODUÇÃO

Aeromonas são bacilos Gram-negativos, de vida livre, anaeróbios facultativos. Inicialmente, este gênero era classificado como membro da família Vibrionaceae, pertencentes dessa família os gêneros *Vibrio spp.* e *Plesiomonas shigelloides* (1). Nos últimos 15 anos, uma extensa revisão na nomenclatura e taxonomia do gênero *Aeromonas* foi realizada. De acordo com Colwell et al, 1986 filogeneticamente, o gênero não se enquadrava exatamente nesse grupo e, com base em evidências genéticas e moleculares, sugeriram a criação de uma nova família, chamada de *Aeromonadaceae*, sendo essa classificação muito bem aceita, até os dias atuais. (2) A recente edição do Manual Bergeys, lista três gêneros como pertencentes a essa família: *Aeromonas*, *Oceanimonas*, *Tolumonas*, *Zobellella* (3,4,5,6).

Rodrigues e Ribeiro em 2004 descreveram que, a partir de 1984, o gênero *Aeromonas* foi separado fenotipicamente em quatro espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* e *A. salmonicida*. Esta última, com três subespécies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*. (4)

Aeromonas spp encontram-se amplamente distribuídas na natureza, são habitantes de ecossistemas aquáticos que incluem águas subterrâneas e potáveis de sistema de tratamento de distribuição de águas, assim como lagos e rios contaminados. Também se encontram em ambientes marinhos com baixa e alta concentração de sal, em estuários, solos, sedimentos, em alimentos incluindo carne, pescado, vegetais, leites e aves, assim como de isolados de casos clínicos (7).

Os primeiros casos de associações de *Aeromonas* com doença humana foram relatadas por von Graevenitz e Mensch em 1968, numa revisão de 30 casos de infecção e colonização por *Aeromonas*, proporcionando evidência para o seu reconhecimento como agentes patogênicos humanos e sugerindo que algumas espécies podem estar associadas com doenças gastrointestinais. (8)

Aeromonas encontram-se associadas também a patologia em répteis e peixes. Após a década de 90 do século XX, bactérias do gênero *Aeromonas*, principalmente as espécies *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sóbria* e *A. caviae*, passaram a ser consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como um dos cinco mais freqüentes agentes patogênicos em humanos.

Aeromonas spp. causa uma variedade de infecções intestinais e extra-intestinais em vários sistemas e órgãos. Normalmente infecções por *Aeromonas* ocorrem por traumas em ambiente aquático ou disseminação do trato gastrointestinal como resultado de doenças subjacentes. (9). Ambas as infecções extra-intestinais e gastrointestinais são conhecidas por ocorrer em hospedeiros saudáveis, bem como hospedeiros imunocomprometidos ou susceptíveis (6).

Embora existam várias espécies de *Aeromonas*, apenas sete são reconhecidas como agentes patogênicos humanos. *Aeromonas* associados com diarreia humana incluem *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *sóbria*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaei* e *A. trota* (6). Sendo que *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. veronii* biovar *sóbria* constituem 85% de todos os isolados clínicos envolvidos com infecções intestinais e extra-intestinais (10).

A gastroenterite é a mais prevalente forma de infecção humana causada por *Aeromonas spp* em todo mundo. Trabalhos como de Arreola et al 2007 e de Guerra et al 2007 demonstraram que *Aeromonas spp* predominava entre os patógenos encontrados em isolados clínicos de pacientes que apresentavam quadro de diarreia.(11,12)

No entanto, esses microrganismos são descritos como agentes causais de outras infecções, tais como: septicemias, endocardites, meningites e pneumonias, embora estas possam ocorrer com menor frequência e, normalmente, estejam associadas a pacientes imunodeprimidos. (13,14,15,16). Outras infecções também têm sido associadas a bactérias desse gênero, como: infecções de pele, do trato urinário, oculares, síndrome urêmica hemolítica (6).

No Brasil, *Aeromonas spp* foi o principal agente patogênico isolado de amostras de fezes de crianças devido a um grande surto de doença diarreica

aguda que ocorreu em São Bento da Una no estado do Pernambuco em 2004 (17).

Alguns estudos destacam também a característica de sazonalidade, os quais revelam que épocas de temperaturas ambientais elevadas (verão) apresentam maiores índices de isolamento deste patógeno (18).

A virulência de *Aeromonas spp.* é multifatorial e seu mecanismo de patogenicidade ainda não está bem estabelecido. Fatores que contribuem para a virulência deste gênero incluem: toxinas, hemolisinas, adesinas, aglutininas, entre várias enzimas hidrolíticas como: amilase, quitinases, elastases, nucleases, gelatinases, lecitinases, lípases e proteases. (19,20,21).

Esses fatores de virulência estão presentes em duas formas, associados à estrutura celular e produtos extracelulares. Entre os associados à estrutura celular estão as fimbrias, flagelos, proteínas de membrana, lipopolissacarídeo, e capsulas (22,23,24). Os produtos extracelulares incluem citotoxinas, hemolisinas, e enterotoxinas (25,26).

A aerolisina é considerada um dos principais fatores de virulência de *Aeromonas*, sendo esta citotoxina capaz de provocar a lise em eritrócitos de carneiro e acúmulo de fluido em intestino de camundongos (27,28). Essa toxina codificada pelo *gene Aer* é capaz de induzir a formação de poros na membrana celular e lise (27, 29,30).

Martins et al, 2002 observaram em sobrenadantes de cultura de *A.sobria* e *A.veronii*, uma enterotoxina citotóxica que induz intensa vacuolização e morte em culturas de células Vero (células de rim do macaco africano verde) e ainda, acúmulo de fluido em intestino de camundongos. Essa toxina foi denominada de fator citotóxico vacuolizante (VCF). (31)

Em 2007, Martins et al demonstraram que o VCF é uma serina protease, parcialmente neutralizada por antissoro (anti-aerolisina) produzido por *A.hydrophila*. Além da atividade vacuolizante e desordem mitocondrial, VCF induz apoptose em células Vero. (32)

A morte celular programada ou apoptose é um processo fisiológico de morte celular pelos quais as células que perderam suas funções ou apresentam defeitos são eliminadas do organismo. (33)

A resistência a apoptose é característica das células metastáticas, assim, a indução seletiva da apoptose tumoral tem sido alvo no desenvolvimento de terapias anticâncer. (34)

Apesar de os protocolos terapêuticos serem universais e apresentarem boa resposta entre 30% e 50% dos pacientes estes tem um novo tumor em cinco anos. Por essa razão várias pesquisas vem sendo desenvolvidos em todo mundo na tentativa de melhorar terapias existentes. (35)

Experimentos envolvendo cultivo celular se tornaram uma importante ferramenta no estudo do comportamento da célula cancerígena, bem como a busca de novas formas de tratamento.

Os primeiros trabalhos utilizando cultura de células tumorais foram desenvolvidos por Moscona, 1957, o qual analisou a interação de células de melanoma em agregados celulares que ele denominou de quimeras. Esses agregados apresentavam uma morfologia semelhante aos tumores que os originaram, mantendo até algumas propriedades quando estas eram crescidas em associação com células normais. (36)

Halpern et al., 1966 demonstraram que o arranjo destes agregados bem como a sua tumorigenicidade eram diferentes quando se utilizava células normais do que quando se utilizava células tumorais. (37)

Mcallister et al, 1967 abordou o comportamento diferenciado de células malignas. A morte das células normais na presença de uma superfície de ágar era para esses autores, uma prova de que células normais dependiam da ancoragem desta célula ao substrato. Sabia-se já naquela época que células derivadas de tumores malignos perderiam essa dependência, sendo esta característica então refletida na sobrevivência das culturas dessas células. (38)

Trabalho de Sutherland et al em 1970, padronizaram um modelo que mimetizava o ambiente e metabolismo de um tumor. Trabalhando inicialmente com linhagens derivadas de pulmão de Hamster, esse grupo desenvolveu uma

técnica que utilizava frascos que permitiam um fluxo do meio de cultura no seu interior, impedindo assim adesão das células com o substrato(39)

O cultivo de células tumorais humanas permite a avaliação dos efeitos diretos e indiretos dos mais diversos tipos de tratamentos. Experimentos envolvendo cultivo celular se tornaram uma importante ferramenta no estudo do comportamento da célula cancerígena, bem como a busca de novas formas de tratamento. (40,41)

Estudos conduzidos em nosso laboratório de células tumorais tratadas com o VCF têm demonstrado que essa citotoxina apresenta uma ação inibitória no crescimento dessas células, inclusive de células com fator de resistência a múltiplas drogas quimioterápicas (MDR).

Verificou-se também neste estudo que o tratamento com o VCF não afetou a proliferação de células saudáveis. Indicando maior susceptibilidade das células tumorais ao tratamento com essa toxina.

Com base nesses dados, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação tóxica do VCF como um possível agente antitumoral em diferentes linhagens de células tumorais “in vitro”.

2. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação citotóxica e o efeito antiproliferativo do VCF em diferentes linhagens de células tumorais humanas.

2.1 Objetivos específicos:

- Detecção da atividade citotóxica do VCF em células tumorais humanas
- Avaliar o efeito anti-proliferativo do VCF em diferentes células tumorais humanas

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostra bacteriana e extrato bruto

Isolado clínico AS 31 de *A. veronii* *bv. sobria* foi utilizado para a produção e purificação do VCF conforme protocolo descrito por Martins et al 2002 (31). Sobrenadante das culturas de *A. sobria* AS-69

e *Escherichia coli* K12/711 foram usados como controles negativos. Os isolados foram cultivados em TSB (caldo de soja tripticase), pH 8.0, a 37°C, com agitação por 18 h (New Brunswick Sci.). Os meios de cultura foram centrifugados a 10.000 xg durante 30 min. Sobrenadantes de cultura foram ultra-filtrados usando membranas XM-50 (concentração de 100 vezes) e submetidos a análise cromatográfica.

3.2. Purificação do VCF

O processo de purificação do VCF foi conduzido conforme descrito por Martins et al. 2007(32) com algumas modificações: após cromatografia de afinidade de íon metálico (IMAC), frações com atividade citotóxica foram coletadas e concentradas em filtros Centricon 3000 KDa MW (Millipore, EUA). Essas frações foram aplicadas em coluna cromatográfica de exclusão molecular Superdex 200 (Amersham-GE Healthcare) e o tampão de corrida utilizado foi o Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Os picos de proteína eluída foram dialisados em PBS 50 mM pH 7.4 e analisados tanto em ensaios biológicos quanto de dosagem de proteína. No ensaio de dosagem proteica foi utilizado o kit de dosagem de proteína Bradford (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante. O processo de purificação foi monitorado por SDS-PAGE sob condições redutoras Laemmli, 1970(42) utilizando géis de poliacrilamida a 13% e os marcadores de peso molecular (Sigma,USA).

Após a corrida os géis foram corados com coomassie blue, segundo metodologia de Fairbanks et al. 1971 (43), ou com nitrato de prata, segundo metodologia de Blum et al(ano) (44).

3.3. Determinação do ponto isoelétrico através de eletroforese 2D.

Eletroforese de segunda dimensão (2D) foi realizado com um sistema de focagem IPGphor Ettan (GE Healthcare Life Sciences, EUA) utilizando tiras de IPG com pH 3 a 10, seguindo as instruções do fabricante. Na primeira dimensão foi feita a focalização do VCF purificado (50 µg). O sistema de focagem foi controlado pelo sistema de software IPGphor Ettan e acumulou 30.000 V/H total de focagem. Na segunda dimensão foi feito através de gel 12% SDS-PAGE convencional Laemmli, 1970(42) com as tiras de IPG focalizadas e em seguida o gel foi corado com corante azul de Coomassie. Imagens de gel foram capturados com a Imagem Scanner sistema III (GE Healthcare Life Sciences, EUA) e foram analisadas com o software Platinum ImageMaster 2D (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

3.4. Atividade citotóxica do VCF

3.4.1 Cultura celular

No ensaio de citotoxicidade foram utilizadas as seguintes linhagens celulares tumorais humanas: HEC-1-B (Adenocarcinoma de endométrio uterino), NCI-H292 (carcinoma pulmonar humano), Caco-2 (Adenocarcinoma colo retal humano), HeLa (adenocarcinoma cervical humano), HEp-2 (carcinoma de laringe humano), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplas drogas quimioterápicas), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (colón), K562 (leucemia) e a linhagem não tumoral de células Vero (rim de macaco verde africano).

Todas essas células foram fornecidas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As células foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos com MEM (meio essencial mínimo de Eagle) ou RPMI (Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado (Nutricell), de acordo com as suas necessidades nutricionais, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino.

3.4.2 Ensaio de atividade citotóxica do VCF

Para os ensaios de citotoxicidade, as monocamadas de cada linhagem de células foram cultivadas em placas de 24 e 96 poços. A toxina purificada foi aplicada sobre as células crescidas em lamínulas em uma concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (32), em triplicata. As lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas em 10% (v/v) de solução de formaldeído em PBS, durante 1 h, lavadas com água destilada e coradas com hematoxilina-eosina (HE) segundo metodologia de Mello e Vidal 1980 (45). As lamínulas foram montadas em lâminas com Entellan (Merck, Alemanha) e analisados por microscópio invertido. (Nikon Instruments, Japão).

3.4.3 Ensaio de efeito anti-proliferativo do VCF

Nos ensaios de inibição do crescimento foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas agressivas como: MCF-1(mama), 786-0(rim), PC-3(próstata), UACC-62(melanoma), NCI-H460(pulmão), HT-9(intestino), K562 (leucemia), NCI-ADR/RES (ovários resistentes a múltiplas drogas quimioterápicas) e células Vero foram incluídas como controle.

Os ensaios foram realizados em monocamadas cultivadas em placas de 96 poços como descrito em Fátima et al. 2006 (46), utilizando VCF purificado em diferentes concentrações, a partir de 1 mg/mL^{-1} . A toxina purificada foi diluída com o meio de cultura celular apropriado (MEM ou RPMI), e os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados obtidos foram analisados por regressão não linear sigmóide com software Origin 7.5 (OriginLab, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Purificação do VCF

Como pode ser observado na Fig. 1A, o VCF foi altamente purificado para prosseguir o estudo proposto.

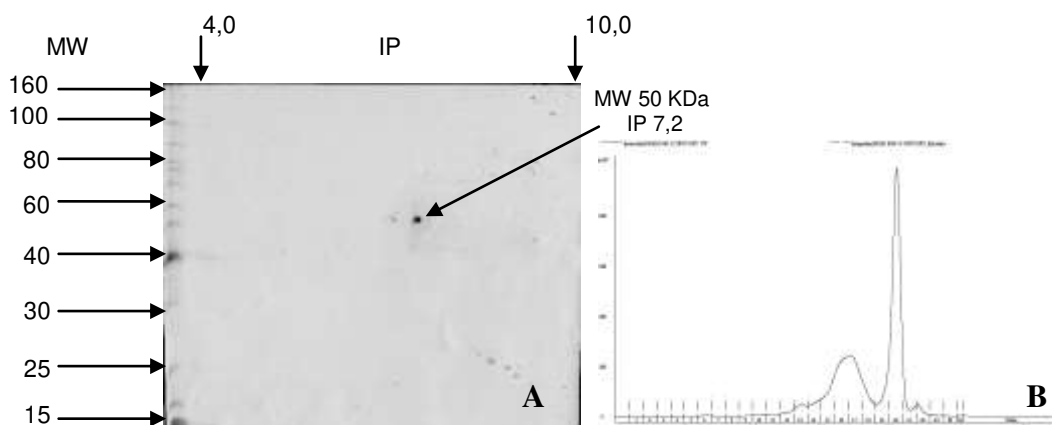


Figura 1A. Eletroforese Bi-Dimensão (2D) de VCF conduzida por sistema de imagem Master 2D (GE biosciences, USA). A seta indica massa molecular (kDa) e o ponto isoeletrico (IP). Figura 1B. Perfil cromatográfico obtido em cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna de Superdex 200. As frações cromatográficas marcadas com a cor vermelha indica contem atividade citotóxica.

4.2 Ação tóxica do VCF sobre linhagens de células tumorais humanas

Nos ensaios citotóxicos em células tumorais humanas foi observado que VCF induz morte celular em diferentes linhagens de células utilizadas neste estudo. O VCF foi capaz de induzir intensa vacuolização celular, condensação da cromatina nuclear e morte de linhagens celulares tumorais humanas, nas mesmas concentrações utilizadas em células Vero (2,5 μ l, definida como a dose citotóxica a

50%, CD50, de acordo com Martins et al (32), entre 15 e 30 minutos após a sua aplicação (Figura 2).

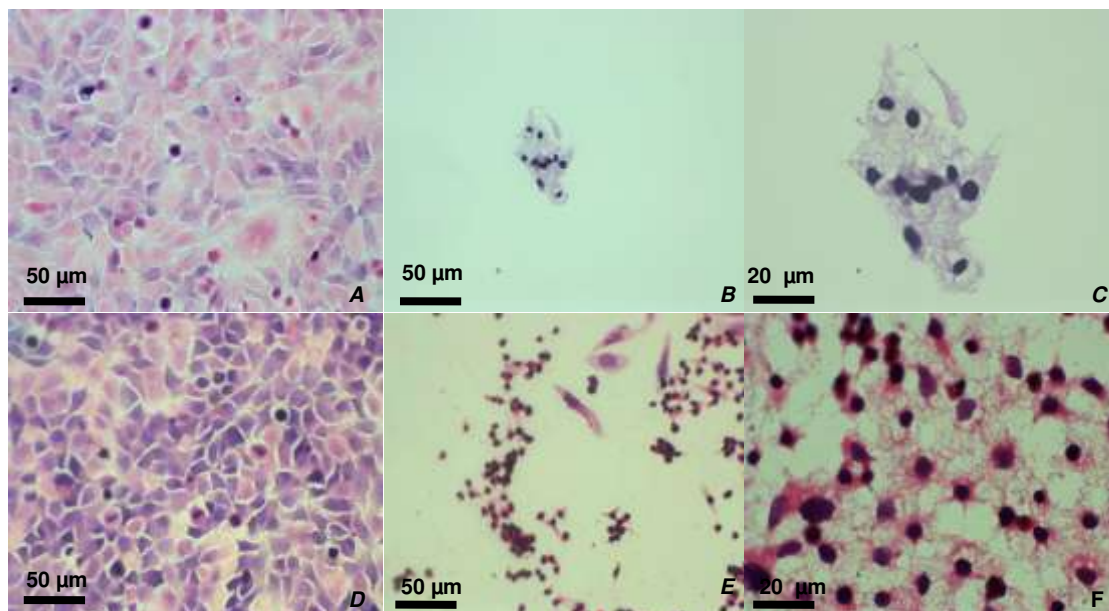


Figura 2. Efeitos citotóxicos observados em células tumorais de humano após 30 minutos da ação do VCF ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). As células foram coradas com hematoxilina/eosina (HE). A - NCI-H292 controle celular; B e C - NCI-H292 sob ação tóxica da VCF, mostrando intensa vacuolização celular e morte; D - Hep-controle celular, E e F - VCF ação tóxica provocando vacuolização celular, condensação nuclear e morte.

4.3 Efeitos anti-proliferativo do VCF em diferentes células tumorais humanas.

Como mostrado na Figura 3, nos ensaios de inibição do crescimento em células tumorais. A NCI-ADR/RES uma linhagem de células de ovário humano, que são resistentes a múltiplos fármacos de quimioterapia teve inibição do seu crescimento após tratamento com VCF por 48 horas, com doses de $1 \mu\text{g/mL}$ a $0,01 \mu\text{g/mL}$.

A K562 uma linhagem de células leucêmica apresentou se como a mais sensível à ação tóxica do VCF.

Células UACC-62, NCI-H460 e PC-3 (próstata) apresentaram pouca sensibilidade ao tratamento com o VCF, e as outras culturas analisados, incluindo as células Vero, não mostraram inibição significativa da proliferação.

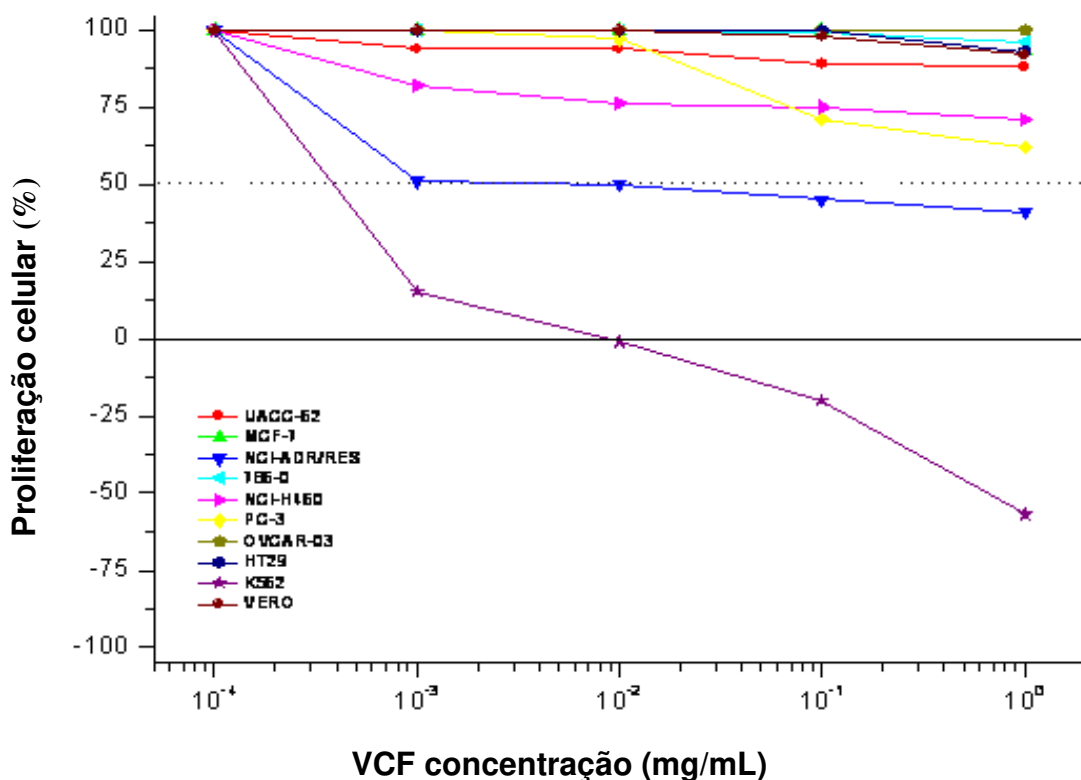


Figura 3. Ensaio de Inibição do Crescimento 50 (IC 50%) foi usado para determinar as concentrações necessárias para 50% de inibição *in vitro* do crescimento celular, calculada por regressão não sigmóide tipo linear, por software Origin 7.5, nos ensaios de aplicação da toxina VCF puro, em concentrações de ,1ng/mL a 1 µg/mL ao longo de diferentes linhagens de células de tumores humanos, durante 48 horas. Linhagens celulares utilizados: UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário

resistentes a múltiplas drogas quimioterápicas), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (intestino), K562 (leucemia). Controle de célula normal: VERO (células epiteliais de rim de macaco verde).

5. DISCUSSÃO

Aeromonas spp. produz vários fatores de virulência, destacando-se a aerolisina, uma proteína de 50kDa, considerada o fator de virulência mais importante do gênero e está relacionada à patogenicidade desta espécie. (47, 48, 49).

Martins et al (32) realizaram ensaio com o VCF purificado produzido de *A. veronii* biovar *sobria* e verificaram que esta toxina é uma enterotoxina capaz de causar efeito em camundongos recém-nascidos, com resultados de atividade enterotóxica superior a 0,88, assim como foi positivo para alças ligadas em coelho, demonstrando aumento e acúmulo de fluidos no interior das alças, principalmente nas regiões do jejuno e íleo destes animais, sugerindo que esta toxina possa estar associada á patologia em humanos.

Foi observado que o VCF apresenta um ponto isoelétrico (PI) de 7.2 determinado por eletroforese 2D. A massa molecular de 50 kDa foi determinada através de espectrometria de massa. Esses dados mostram que o VCF é diferente da toxina vacuolizante (**VacA**) de *Helicobacter pylori* de 87 kDa e um ponto isoelétrico de 5.83 (50).

Toxinas vacuolizantes podem induzir formação de vacúolos nas células e alterar o transporte de solutos através das membranas celulares. Sugerindo que este mecanismo possa ser responsável pela rápida formação de vacúolos em células eucarióticas após a adição da toxina (51)

Uma análise feita através de espectrometria de massa revelou que o VCF tem 90% de similaridade com uma superfamília de proteínas que se ligam a hidratos de carbono, que tem sido descrita em sequência de genoma de *A. salmonicida* e *A. hydrophila* (52). *A. salmonicida* é conhecida como um importante patógeno de peixe e répteis. Estas bactérias induzem lesões de pele e morte em uma grande quantidade de cardumes de salmão, causando um grande dano econômico (53,54).

O VCF foi capaz de induzir intensa vacuolização celular, condensação nuclear e morte das células Hep-2, Caco-2, HeLa e NCI-H 292 nas mesmas

concentrações utilizadas em células Vero 2,5µl definida como dose citotóxica IC 50, 30 minutos após sua aplicação.

Neste ensaio foram observadas atividades similares ao observado em células Vero por Martins et al (32) onde o VCF causou alterações morfológicas tendo como principais características, uma intensa vacuolização citoplasmática perinuclear, com intensa condensação nuclear, seguido para morte por apoptose.

A apoptose é definida como um processo que aciona a morte celular programada e é indicada como um dos possíveis mecanismos utilizados pelos microorganismos patogênicos para implantar-se e suprimir a resposta do hospedeiro (55,56,57,58).

Bactérias tais como *E. coli*, *Shigella spp.* e *Salmonella spp.*, associadas às doenças gastrointestinais tem sido reconhecidas como indutoras de apoptose (59).

Toxinas como a-hemolisina e aquelas pertencentes à família de shiga-toxinas produzidas por *E.coli* são capazes de induzir a morte celular programada (60) levando ao arredondamento celular, condensação nuclear, fragmentação de DNA e formação de corpos apoptóticos.

Após estas observações iniciais de toxicidade, foram usadas doses inferiores a IC 50 para construir um perfil de toxina-dependente de inibição de crescimento em linhagens de células tumorais humanas agressivas como: UACC-62 (melanoma), MCF-7(mama), NCI-H460(pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3(ovário), HT-29(intestino), K562(leucemia) e célula Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano) como controle.

Foram observados que algumas linhagens de células tumorais se apresentaram mais sensíveis à ação tóxica do VCF, em particular as células de ovário humanas (NCI-H460), que são consideradas resistentes a múltiplos quimioterápicos e a célula K562 uma linhagem de células leucêmica humana.

Estes resultados mostram que, em função da dose aplicada, algumas culturas celulares tumorais se apresentam mais sensíveis ao tratamento com o VCF. Apresentando evidências de moderação apenas em concentrações de toxina abaixo de 0,1 ng/mL.

Algumas células se apresentam mais sensíveis que outras ao tratamento com uma determinada toxina, pois essas células devem apresentar receptores específicos, do qual reconhecem uma determinada região dessa toxina.

Uma hipótese da célula K562 ter se apresentado sensível ao tratamento com o VCF, é que esta toxina pode agir especificamente com células do sangue.

Estudos mais aprofundados com diferentes linhagens de células sanguíneas são necessários para elucidar essa hipótese.

Em uma análise de feita através do ensaio de degradação de Edyman Martins et al 2007, verificou-se que o VCF é uma serina protease que pode ser inibida parcialmente por um antissoro anti aerolisina produzido por *A.hidrófila* que se liga a hidratos de carbono. Com base nestas observações, podemos concluir que o VCF produzido por *A. veronii* biovar *sóbria* é uma proteína pertencente a uma família de proteínas de ligação de carboidratos, que inclui ainda a ser caracterizada. (32)

O VCF atua sobre linhagens de células tumorais humanas, que provoca a morte celular ou inibição da proliferação em algumas linhas em concentrações abaixo da CD50. Em estudo mais detalhado será feito para avaliar qual parte da estrutura do VCF está envolvido em sua ação tóxica em células eucarióticas, incluindo receptores celulares que estão envolvidos no reconhecimento.

O VCF induz a morte de células eucarióticas através de vias apoptóticas, estudos futuros *in vivo* deverão ser realizados para avaliar o VCF como um possível agente antitumoral e a aplicabilidade desta toxina em animais portadores de neoplasias.

6. CONCLUSÕES

O VCF purificado foi biologicamente ativo para células tumorais humanas como HEp-2, Caco-2, HeLa e NCI-H 292.

O VCF demonstrou uma potencial atividade de inibição de crescimento *in vitro*, de algumas células tumorais humanas, como NCI-ADR/RES, uma linhagem celular que é resistente a múltiplas drogas de quimioterápicas e a célula K562 célula leucêmica.

Atividade antitumoral em diferentes células de carcinoma humano demonstra que o VCF pode ser uma possível droga quimioterápica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Grengesh KS, Ahmed SF, El Khalek RA, Al Gendy A, Klena J. *Aeromonas*-associated infections in developing countries. *Journal Infect Developing Countries*, v.2, n.2, p.81-98, 2008.

2-Cowell RR, Macdonel M T, Ley J. Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.36, n.3, p.473-477, 1986.

3-Abbott SL, Cheung WKW, Janda JM. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology*. v.41, n.6, p.2348-2357, 2003.

4-Rodrigues DP, Ribeiro RV. *Aeromonas*. In: VIEIRA, R. H. F. *Microbiologia higiene qualidade do pescado- teoria e prática*. São Paulo: Varela, 2004, 380 p.

5-Euzéby, J. P., 2008. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature ([http: www.bacterio.cict.fr/.](http://www.bacterio.cict.fr/))

6-Janda MJ and Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity and infection. *Clin Microbiol Rev*. 2010 23:35-73.

7-Alavandi SV and Ananthan S. Biochemical characteristics, serogroups, and virulence factors of *Aeromonas* species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai. *Indian J Med Microbiol*.2003;21:233-8.

8-von Graevenitz A, and Mensch AH. The genus *Aeromonas* in human bacteriology report of 30 cases and review of the literature. *New England Journal of Medicine*. 1968; 278:245-249.

9-Figueras MJ. Relevância clínica de *Aeromonas* sM503. Avaliações em microbiologia Médica. 2005, 16:145-153.

10-Rodrigues, DP, Theophilo GND; Reis EMF, Lazaro NS. Doenças de Transmissão Alimentar: Aspectos Clínicos, Coleta e Transporte de Material. Instituto Osvaldo Cruz/FIOCRUZ, Lab. Ref. Nacional Cólera e outras Entero infecções. Man. Lab. Instituto Osvaldo Cruz/FIOCRUZ, 2008;27p

11-Aguilera Arreola-MG , Hernández Rodríguez-C , G Zúñiga , Figueras MJ , Garduño RA , Castro-Escarpulli G. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. J. Canadian of Microbiol. 2007 53 : 877-887.

12- Guerra IMF, Fadanelli R, Figueiró M, Schreiner F, Delamare LPA, Wollheim C, et al. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: Prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. J. Braz. of Microbiol. 2007;38:638-643.

13-Chao MC, Lai CC, Tang JH, Ko CW, Hsueh RP. Biliary tract infections caused by *Aeromonas* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32:245–251

14-Chao MC, Lai CC, Tang JH, Ko CW, Hsueh RP. Skin and soft-tissue infections caused by *Aeromonas* species. Eur J Clin Microbiol Infect Di. 2012 32(2):245-51

15-Chao MC, Lai CC, Tang JH, Ko CW, Hsueh RP. Pneumonia caused by *Aeromonas* species in Taiwan, 2004-2011. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32(8): 1069-75

16-Carmignani L, Picozzi S, Spinelli M, Di Pierro Salvatore, Mombelli G, Negri E, et al. Bacterial sepsis following prostatic biopsy. *Int Urol Nephrol*. 2012; 44:1055–1063

17-Hofer E, Reis CMF, Theolphilo GND, Cavalcanti VO, Lima NV, Henriques MFCM. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Uma, Pernambuco. *Rev.Soc.Bras. Med.Tropical*.2006;(39): 217-220.

18-Pereira CS, Amorim SD, Santos AFM, Reis , CFM, Theofilo GND, Rodrigues DP. Characterization of *Aeromonas* spp isolates from newborns hospitalized *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41:179-182.

19-Gosling, P. Pathogenic Mechanisms. In: B. Austin, M. Altwegg, P. Gosling & S.W. Joseph (Eds.) *The Genus Aeromonas*. John Wiley & Sons, New York, NY: 1996; 39-76.

20-Nam IY and Joh K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. *Journal of Microbiology*, v.45, n.4, p. 2007;297-304.

21-Aguilera-Arreola M, Hernández-Rodri-Gues CH, Castro-Escarpulli G. Molecular and phenotypic characterization of *Aeromonas hydrophila*-like HG3 isolated of an infant with diarrhea in Mexico. *Bioquimica*, v.34, n.4, p. 2009;183-189.

22- Chakraborty T , Huhle B , Hof H , Bergbauer H , Goebel W . Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *Aeromonas hydrophila* associated systemic infections. *Infection & Immunity*. 1987; 55(9):2274-2280.

23- Buckley JT , Halasa LN , Lund KD , MacIntyre S. Purification and Some Properties of the Hemolytic Toxin Aero Lysin. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1981;59(6):430-435.

24-Howard SP, MacIntyre S, Buckley JT. 1996. Toxins. In: B. Austin, M. Altwegg, P. Gosling & S.W. Joseph (Eds.) *The Genus Aeromonas*. John Wiley & Sons, New York, NY: 1996;39-76.

25- Krzyminska S, Mokracka J, Koczura R, Cwiertnia A, Kaznowski A. *Aeromonas* spp.-mediated cell-contact cytotoxicity is associated with the presence of type III secretion system. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012; 101:243–251

26-Giovanni SG, Bijay K, Khajanchi KB, Sierra CJ, Erova ET, Sha J, et al. Actin cross-linking domain of *Aeromonas hydrophila* repeat in toxin A (RtxA) induces host cell rounding and apoptosis *Gene*. 2012; 506 : 369–376

27-Abrami L, M Fivaz, van der Goot FG. Surface dynamics of aerolysin and the plasma membrane of living cells. *Int. J. Med. Microbiol*. 2000; 290, 363-367.

28- Fálcon RM, Carvalho HF, Joazeiro PP, Gatti MS, Yano T. Induction of apoptosis in HT-29 human intestinal epithelial cells by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. *Biochem. Cell Biol* 2001; 79:525-31.

29- Esteve C and Birbeck TH. Secretion of haemolysins and preteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (Elastase). *J. Appl. Microbiol*. 2004; 96:994-1001.

30- Fujii Y, Nomura T, Yokoyama R, Shinoda S, Okamoto K. Studies of the mechanism of action of the aerolysin-like hemolysin of *Aeromonas sobria* in stimulating T84 cells to produce cyclic AMP. *Infection & Immunity* 2003; 71(3):1557-1560.

31-Martins LM, Falcón RM, Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and clinical cases. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2002; 32:237-242.

32-Martins, L.M., Catani, C.F., Falcón, R.M., Carbonell, G.V., Azzoni, A.A., Yano, T., Induction of apoptosis in Vero cells by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* vacuolating cytotoxic factor. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2007; 49:197-204.

33-Garay M H, Alves J, Ochiucci M J, Belizário E J. Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.2003; Ed nº30.

34-Schwartz GK, Haimovtz-Friedman A, Dhupar SK, Ehleiter D, Maslak P, Lau L, Laganzo F.Jr, Kelsen DP, Fucks Z, Alpino AP. Potentiation of apoptosis by treatment with protein kinase-c specific inhibitor safinol in mitomycin c treated gastric cancer cells. J. Nat. Cancer Inst 1995; 87: 1394-9.

35- Moraes, e.d., Lessa, G.S. Angra, I. et al., Tumores de cabeça e Pescoço In: Guimarães, J.R.Q. Manual de Oncologia Clínica, São Paulo: BBS, 2004;29-55.

36-Moscona, A. The Developmet in vitro of Chimeric Aggregates of Dissociated Embryonic Chick and Mouse Cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1957; 43:184-194.

37-Halpern, B. et al. Differences in Patterns of Aggregation of Malignant and Non-Malignant Mammalian Cells. Nature. 1966;209:157-159.

38-Mcallister, R. M. et al. Colonial growth in agar of cells derived from adenovirusinduced hamster tumors. Journal of the National Cancer Institute.1967; 39: 43-53.

39-Sutherland, R. M. et al. A multicomponent radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology*,1970; 18:491-495.

40-Bissel, M. et al. Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*2005; 70:343 – 356.

41-Eritja, N. et al. A Novel Three-Dimensional Culture System of Polarized Epithelial Cells to Study Endometrial Carcinogenesis. *The American journal of pathology.*2010; 176: 2722-2731.

42-Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*1970; 227:680-685.

43-Fairbanks G , Steck TL , Wallach D F (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane *Biochemistry.* 1971 10:2606-2617.

44-Blum H, Beier H and Groos HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Eletrophoresis.*8:93-99.

45-Mello ML and Vidal B. *Práticas em Biologia Celular.* Rio de Janeiro: Edgard Blucher, (Appendix 71).1980.

46-Fátima A, Kohn LK, Carvalho JE, Pilli RA. Cytotoxic activity of (S)-goniothalamine and analogues against human cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14, 622-631

47-Umesha D, Rao SPK, Prasad P, Reddy AK, Srinivas K.N. Aerolysin and hemolysin virulence genes of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased

ornamental freshwater oscarfish and gold fish by polymerase chain reaction. International Journal of Advances in Science and Technology: 2011;Vol. 3, No.1.

48-von Graevenitz A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. Infection 2007; 35:59–64.

49-Castilho BCM, Castro AALT, Araujo SV, Trajano SR, Santos AP, Paula MC. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. Antonie van Leeuwenhoek. 2009; 96:53–61

50-Cover, L. T and Blaser M J. Purification and Characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. Journal of Biological Chemistry Vol. 267, No. 15, pp. 1992; 10570-10575,1592 .

51-Cover TL. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol.1996; 20:241-5.

52-Reith ME, Singh RK, Curtis B, Boyd JM, Bouevitch, A, Kimball J, et al.The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. BMC Genomics 2008; 9, 427.

53-Krovacek K, Huang K, Sternberg S, Svenson SB. *Aeromonas hydrophila* septicaemia in grey seal (*Halichoerus grypus*) from the Baltic Sea: a case study. Comp Immunol Microbiol Infect Dis.1998; 21(1):43-49.

54-Ringø E, Jutfelt F, Kanapathippillai P, Bakken Y, Sundell K, Glette J, Mayhew TM, Myklebust R, Olsen RE. Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)ssp. Cell Tissue Res (2004) 318: 305–311.

55-Fernandez-Prada CM, Hoover DL, Tall BD, Venkatesan MM. Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexneri* in vitro undergo a rapid cytolytic event similar to oncosis but not apoptosis. *Infect Immun.* 1997;65:1486-96.

56-Merrien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun.*1997;65:729-738.

57-Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease *Science.* 1995;267:1456-61.

58-Zichlinski A. Programed cell death in infectious diseases. *Trends Microbiol.* 1993;1:114-7.

59-Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 1999; 53:155-87.

60-Cavalieri S, Bohach G, Snyder I. *Escherichia coli* alpha hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev.* 1984; 48: 326-43.

8. APÊNDICES

8.1 Artigo submetido

8.1.1 Apêndice 1- Artigo submetido à revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*

Vacuolating Cytotoxic Factor (VCF) produced by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* inhibits human tumor cells growth *in vitro*

Martins, L. M.^{a.1*}, Oliveira L.^{a.1}, Ruiz A.L.T.G.², Spindola H.M.², Tinti S.V.², Foglio M.A.², Arimitsu, H.³, Tsuji, T.³, Yano, T.¹.

¹Instituto de Biologia, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

³ Department of Microbiology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi, 470-1192, Japan.

* Present adress: Centro de Bacteriologia, Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

^a These authors contributed equally.

Corresponding author:

Dr. T.Yano

Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. P.O. box: 6109, 13081-970, Campinas, SP, Brasil.

e-mail: tyano@unicamp.br

Abstract

We described previously an enterotoxic-cytotoxin named vacuolating cytotoxic factor (VCF) produced by *Aeromonas sobria* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. Here, we show that the VCF have a potential to inhibit growth of different human tumor cell lines such as UACC-62 (melanoma); MCF-7 (breast); NCI-ADR/RES (ovary resistant to multiple chemotherapy drugs); 786-0 (kidney); NCI-H460 (lung); PC-3 (prostate); OVCAR-3 (ovary); HT-29 (intestine colon), K562 (leukemia), HEC-1-B (human uterus endometrium adenocarcinoma), NCI-H292 (human pulmonary carcinoma) *in vitro*. Our data demonstrates the anti-proliferative activity of VCF in vitro, this toxin possess interesting properties for its evaluation for development of chemotherapeutic agents and opens ways for discovering other applications for bacterial toxins.

Key words: Vacuolating Cytotoxic Factor, *Aeromonas veronii* biovar *sobria*, cytotoxic activity, human tumoral cell lines.

The genus *Aeromonas* comprises facultative anaerobic Gram-negative rod-shaped bacteria, classified in the *Aeromonadaceae* family (1, 2) and is known to be

widespread and frequently isolated from aquatic environment, where it is commonly associated to fish and reptile diseases (3). Also human diseases caused by this pathogen have been reported and were associated to contaminated water and food consumption. These diseases include human gastroenteritis, caused by this diarrheagenic and infective pathogen in immune-compromised individuals (4, 5, 6).

Diverse *Aeromonas* virulence factors have been described (7, 8, 9, 10), of which 'aerolysin', a hemolysin, cytotoxic-enterotoxin has been well characterized (11,12). Also, our research group described the production of a cytotoxic-enterotoxin named vacuolating cytotoxic factor (VCF) by *Aeromonas sobria* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria*, which induces intense intracellular vacuolization and mitochondrial disorders by signaling apoptotic pathways (13, 14), which was applied in this work.

The cell cultures of HEC-1-B (human uterus endometrium adenocarcinoma), NCI-H292 (human pulmonary carcinoma), Caco-2 (human colorectal adenocarcinoma), HeLa, (human cervix adenocarcinoma), HEp-2 (human laryngeal carcinoma), were used in the cytotoxic assays. The cells UACC-62 (melanoma); MCF-7 (breast); NCI-ADR/RES (ovary cells resistant to multiple chemotherapy drugs); 786-0 (kidney); NCI-H460 (lung); PC-3 (prostate); OVCAR-3 (ovary); HT-29 (intestine colon), K562 (leukemia) and the normal lineage Vero (african green monkey kidney), belonging to the collection of the Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) of the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), were used for the growth inhibition assays. The cells were grown in tissue culture flasks with MEM (Eagle's minimum essential medium) or RPMI medium (Nutricell), accordingly to their nutritional requirements, supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum.

After 72 hours of incubation with purified VCF (14) at concentrations lower than $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, Vero cells remained viable, while some tumor cell lines like NCI-H460, PC-3, NCI-ADR and K562 were killed. Moreover, it was observed that the UACC-62 cells, from melanoma tumor, were poorly sensitive to VCF at the concentration of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, while OVCAR-03, 786-O, HT-29 and MCF7 cells were not affected by

the toxin under these toxin concentration. These results suggest the expression of different levels of sensibility to VCF among the diverse tumor cell lineages assayed, however the cellular mechanisms of this cell lineage-dependent cytotoxicity remains unclear.

To the growth inhibition assays, cell lineages derived from aggressive forms of human cancer were used. This assay was performed on 96 wells culture microplates accordingly to Fatima *et al.* (15), using purified VCF. Different concentrations were tested (1 to 10^{-4} $\mu\text{g mL}^{-1}$). The purified toxin was diluted in cell culture medium (MEM or RPMI) and assays were conducted in triplicate. The data obtained were analyzed by sigmoid non linear regression using the Origin 7.5 software.

The results showed that, regardless the VCF concentration, some tumor cell lineages are more or less sensitive to the action of toxin, in particular the UACC-62, NCI-H460, PC-3 and NCI-ADR/RES lineages. The K 562 cell lineage from human leukemia showed to be the most sensitive to the VCF action. The mechanisms by which means VCF induces anti-proliferative action on these human tumor cell lineages are not well understood but the application of bacterial toxins may represent an alternative strategy to decrease the high proliferation rates of tumoral cells. The different sensibility of different cell lineages to the cytotoxic action of VCF may be explored in the future to developed therapeutic agents for specific tumoral cells. An interesting property of VCF toxin is that it kills cells by apoptotic ways (14), not provoking the consequences of typical necrotic processes.

The Figure 1 shows that the leukemia lineage K562 was the most sensible to the toxic action of VCF and the UACC-62, NCI-H460 and PC-3 cells exhibited weak inhibition of cellular growth. As observed in Figure 2, the human leukemia K562 lineage and the human tumor ovary cells resistant to multiple chemotherapy drugs (NCI-ADR/RES) were inhibited by the VCF action at the range of 1 to 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, after 48 hours. The other analyzed cultures (OVCAR-03, 786-O, HT-29 and MCF7), including the non-tumoral Vero cells, showed low inhibition values of proliferate processes, demonstrating the toxin specificity for certain tumor cells lineages.

The VCF is an enterotoxin (13, 14) that it is cytotoxic for human tumor cell lineages and induces cellular death at toxin concentrations lower than CD_{50} . This potential anti-tumor activity of VCF toxin may be considered for development of new therapeutic agents based on bacterial toxins. In the future, with the support of new technologies, may constitute an alternative which will be used to the development of new drugs and treatments of tumors.

Acknowledgements

We thank Dr Maria Silvia Vicari Gatti, Dr Hernandez F. Carvalho, Dr Aureo T. Yamada for the scientific support given to this work. We also thank and Ana Stella Menegon Degrossoli for technical assistance. This work was financially supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Brazil.

References

1. Alperi A, Figueras MJ, Inza I, Martínez-Murcia AJ. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int Microbiol* 2008; 11: 185-194.
2. Ringo E, Jutfelt F, Kanopathipillai P, Bakken Y, Sundell K, Glette J, Mayhew TM, Myklebust R, Olsen RE. Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* sp *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell Tissue Res* 2004; 318: 305–311
3. Saavedra MJ, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 2481-2487.
4. Alavandi S, Ananthan S, Kang G. Prevalence, in-vitro secretory activity, and cytotoxicity of *Aeromonas* species associated with childhood gastroenteritis in Chennai (Madras), India. *Jpn J Med Sci Biol.* 1998; 51:1-12.
5. Alavandi SV, Ananthan S. Biochemical characteristics, serogroups, and virulence factors of *Aeromonas* species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai. *Indian J Med Microbiol* 2003; 21: 233-238.
6. King GE, Werner SB, Kizer KW. Epidemiology of *Aeromonas* infections in California. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 449-452.

7. Fujii Y, Nomura T, Okamoto K. Hemolysin of *Aeromonas sobria* stimulates production of cyclic AMP by cultured cells. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 176: 67-72.
8. Krovacek K, Faris A, Baloda SB, Peterz M, Lindberg T, Mansson I. Prevalence and characterization of *Aeromonas* spp isolated from foods in Uppsala, Sweden. *Food Microbiol* 1992a; 9: 29-36.
9. Krovacek K, Faris A, Baloda SB, Peterz M, Lindberg T, Mansson I. Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. *Food Microbiol* 1992b; 9: 215-222.
10. Monfort P, Baleux. Haemolysin occurrence among *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* strains isolated from different aquatic ecosystems. *Res Microbiol* 1991; 142: 95-102.
11. Abrami L, Fivaz M, Van der Goot FG. Surface dynamics of aerolysin and the plasma membrane of living cells. *Int J Med Microbiol* 2000; 290: 363-367.
12. Falcón RM, Carvalho HF, Joazeiro PP, Gatti MS, Yano T. Induction of apoptosis in HT-29 human intestinal epithelial cells by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. *Biochem Cell Biol* 2001; 79: 525–531.
13. Martins LM, Falcón RM, Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and clinical cases. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 237-242.
14. Martins LM, Catani CF, Falcón RM, Carbonell GV, Azzoni AA, Yano T. Induction of apoptosis in Vero cells by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* vacuolating cytotoxic factor. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 49: 197-

204.

15. Fátima A, Kohn LK, Carvalho JE, Pilli RA, Cytotoxic activity of (S)-goniothalamine and analogues against human cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 2006; 14: 622-31.

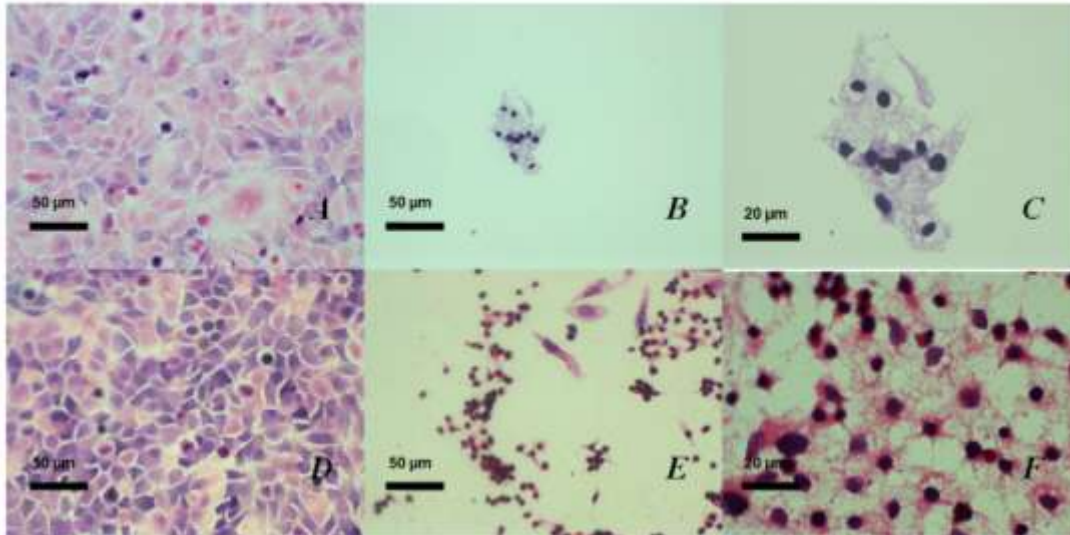


Figure 1. Exemples of cytotoxic effects observed over human tumoral cell lines after 30 minutes of VCF action ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cells were stained with hematoxilin and eosin (HE). A- NCI-H292 cellular control; B and C- NCI-H292 under VCF toxic action, showing intense cellular vacuolation and death; D- Hep-2 cellular control; E and F- VCF toxic action provoking cellular vacuolations, nuclear condensation and death.

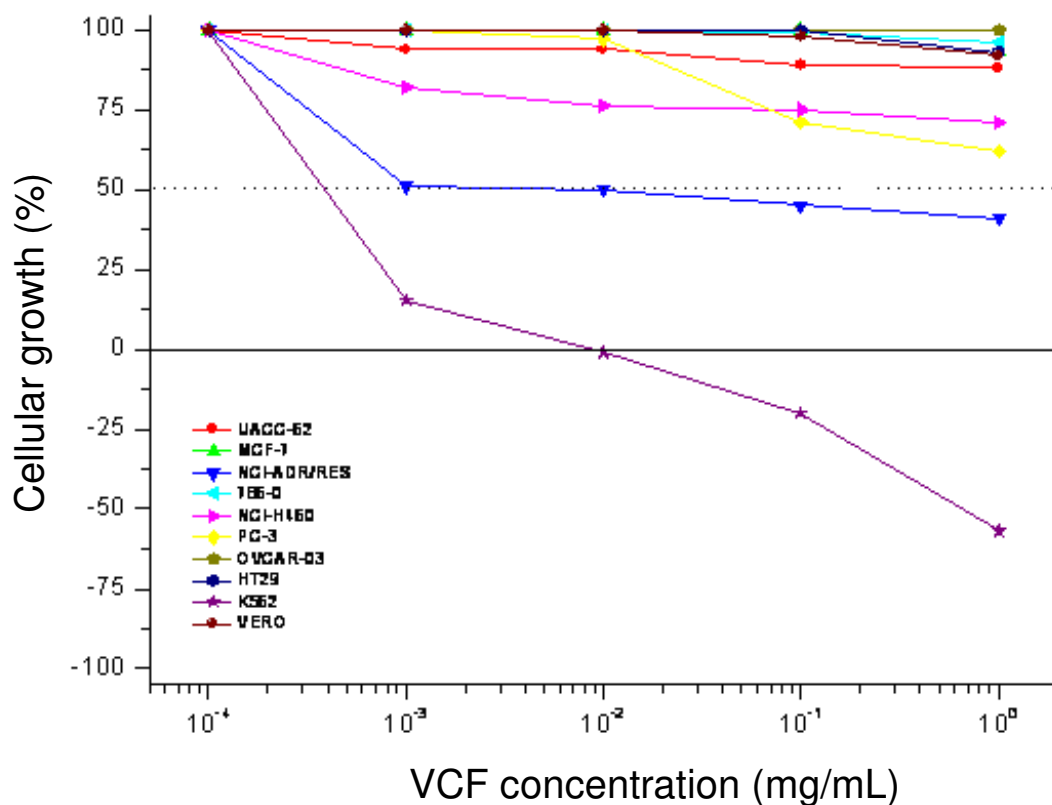


Figure 2. Growth Inhibition 50 (GI 50%) assays, used to determine the necessary concentrations to 50% *in vitro* inhibition of cellular growth, calculated by non linear regression, sigmoid kind, by Origin 7.5 software, on assays applying the pure VCF toxin, at concentrations going from 1 $\mu\text{g/mL}$ to 0,1 ng/mL over different human tumor cell lines, during 48 hours. Cellular lineages used: UACC-62 (melanoma); MCF-7 (breast); NCI-ADR/RES (ovary resistant to multiple chemotherapy drugs); 786-0 (kidney); NCI-H460 (lung); PC-3 (prostate); OVCAR-3 (ovary); HT-29 (intestine); K562 (leukemia). Normal cell control: VERO (Green monkey kidney epithelial cells).