

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO E ANÁLISE *in silico* DE NOVA SUBCLASSE DE  
PARASPORINA DO TIPO 4 DE *Bacillus thuringiensis coreanensis* E  
SUA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

**Thaís Nayara Ferreira dos Santos**

Bióloga

**2024**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO E ANÁLISE *in silico* DE NOVA SUBCLASSE DE  
PARASPORINA DO TIPO 4 DE *Bacillus thuringiensis coreanensis* E  
SUA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

**Discente: Thaís Nayara Ferreira dos Santos**

**Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,  
Câmpus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Genética e  
Melhoramento de Plantas)**

**2024**

S237i

Santos, Thais Nayara Ferreira dos

Isolamento e análise in silico de nova subclasse de parasporina do tipo 4 de *Bacillus thuringiensis coreanensis* e sua potencial aplicação biotecnológica / Thais Nayara Ferreira dos Santos. -- Jaboticabal, 2024

67 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Janete Aparecida Desidério

1. Câncer. 2. Citotoxicidade. 3. Bioinformática. 4. Modelagem de proteína. 5. Filogenética. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

### **Registro de impacto**

Se tratando de uma proteína de *Bacillus thuringiensis* que visa atingir células cancerígenas e não insetos pragas como visto em outras proteínas Bt, o estudo colabora com a expansão da utilização dessa bactéria em outras áreas, além de ajudar a traçar novos caminhos biotecnológicos para sua utilização.

### **Impact record**

Being a *Bacillus thuringiensis* protein that aims to target cancer cells and not insect pests as seen in other Bt proteins, the study contributes to the expansion of the use of this bacterium in other areas, in addition to helping to outline new biotechnological paths for its use.

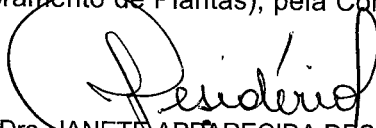
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ISOLAMENTO E ANÁLISE *in silico* DE NOVA SUBCLASSE DE PARASPORINA DO TIPO 4 DE *Bacillus thuringiensis coreanensis* E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

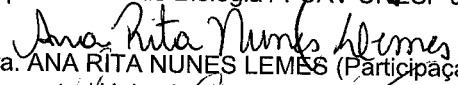
**AUTORA: THAÍS NAYARA FERREIRA DOS SANTOS**

**ORIENTADORA: JANETE APPARECIDA DESIDERIO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO (Participação Presencial)  
Departamento de Biologia / FCAV UNESP Jaboticabal



Dra. ANA RITA NUNES LEMES (Participação Presencial)  
Syngenta / Holambra/SP



Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA (Participação Presencial)  
Departamento de Biologia / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2024

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Thaís Nayara Ferreira dos Santos, nascida em Jaboticabal, São Paulo, em 12 de Setembro de 1996. Filha de Sergio Eduardo dos Santos e Nilza Maria Ferreira dos Santos. Em 2016 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP, na qual foi concluído em 2021. Foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), desenvolvendo o trabalho intitulado “Detecção e análise filogenética de genes parasporina em isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis*”. Durante a graduação realizou diversos projetos de extensão e de empenho acadêmico, como Cursinho Ativo, Jabunesp Recicla, Bateria Universitária, Diretório Acadêmico. Além de realizar estágio extracurricular pela empresa CIEE no Departamento de Patologia Animal da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP. Em 2021, ingressou no programa de Agronomia - Genética e Melhoramento de Planta da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP, como mestranda, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Janete Aparecida Desidério, com financiamento concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em seu período de pós-graduação participou da organização do Curso de Inverno de Genética na qual já havia sido premiada duas vezes por apresentação de pôster. Participou dos projetos de extensão Cultiva Eco e Amaar e ministrou minicursos e palestras sobre técnicas de Biologia Molecular. Possui conhecimento sobre a área de genética molecular e microbiologia. Atualmente tem sua linha de pesquisa voltada ao estudo molecular de parasporinas 4 presentes na bactéria *Bacillus thuringiensis*.

“Amar e mudar as coisas me interessa mais”

Belchior

Aos meus pais Nilza Maria Ferreira dos Santos e Helder Jourdan Lacerda; que sempre me deram toda base e amor do mundo para percorrer meus caminhos e sonhos. A minha tia Maria Solange dos Santos Rodrigues de Oliveira por sempre me apoiar e me ajudar desde criança. Ao meu namorado Edson Carlos Bacarolo Nunes, pelo carinho, amizade, cumplicidade, por sempre me incentivar a alcançar meus sonhos e participar de todas as minhas conquistas. Aos meus amigos que fizeram toda a minha caminhada um pouco mais feliz e amorosa.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, pela confiança, por todo o suporte e ensinamentos no desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Raquel Oliveira Moreira por acreditar em mim e me dar todo apoio, suporte e ensinamentos durante minha trajetória acadêmica.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Campus de Jaboticabal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), nas pessoas do Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda, corpo docente e assistentes da Seção de Pós-Graduação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudo e pelo incentivo à pesquisa.

À Dra. Saura Rodrigues da Silva, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da FCAV/Unesp, pela colaboração e disposição acerca da análise filogenética do trabalho.

À Dra. Elisângela Soares Gomes Pepe, do Programa de Pós-Graduação Microbiologia Agropecuária da FCAV/Unesp, pela colaboração e disposição acerca da análise de Bradford do trabalho.

Ao Mestre Luis Angel Chicoma Rojas, do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV/Unesp, pela colaboração e disposição acerca da análise de bioinformática estrutural do trabalho.

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da FCAV/Unesp, por disponibilizar posturas de *S. frugiperda* mantida no laboratório sob sua coordenação.

À equipe do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), em especial ao Higor de Oliveira Alves, Gleiciane Rocha, Maria Carolina Macario Cordeiro, Gustavo Henrique de Campos e Jardel Diego Barbosa Rodrigues, pela amizade, parceria e por todos os momentos felizes que compartilhamos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> : taxonomia e biologia .....	3
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> : Proteínas cristalinas inseticidas e modo de ação .....	6
2.3. Características gerais das parasporinas .....	10
2.4. Potenciais aplicações biotecnológicas das parasporinas .....	15
2.5. PS1 .....	17
2.6. PS2 .....	18
2.7. PS3 .....	18
2.8. PS4 .....	19
2.9. PS5 e PS6.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Cultivo bacteriano para extração de DNA total .....	21
3.2. Extração de DNA total de <i>Bacillus thuringiensis coreanensis</i> .....	21
3.3. Isolamento do gene <i>ps4</i> por PCR .....	22
3.4. Clonagem do gene <i>ps4</i> de <i>B. thuringiensis coreanensis</i> .....	22
3.5. Confirmação dos clones contendo o gene <i>ps4</i> por PCR e sequenciamento da amostra .....	24
3.6. Análise da sequência obtida .....	25
3.7. Solubilização e ativação da proteína a partir dos cristais .....	26
3.8. Cultivo bacteriano e preparo da cultura de esporos.....	27
3.9. Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura .....	28
3.10. Bioensaios .....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5. CONCLUSÕES .....	45
6. REFERÊNCIAS.....	45

## ISOLAMENTO E ANÁLISE *in silico* DE NOVA SUBCLASSE DE PARASPORINA DO TIPO 4 DE *Bacillus thuringiensis coreanensis* E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

**RESUMO** - *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva que possui suas linhagens estudadas principalmente para o controle de insetos-praga. Porém, recentes estudos apontam a presença de outras proteínas sem ação inseticida conhecida. Essas proteínas denominadas “parasporinas” (PS) possuem atividade citotóxica e apresentam seis classes, sendo PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 e PS6. Entre essas a PS4 apresenta somente uma subclasse descrita, presente na linhagem *Bacillus thuringiensis shandongiensis*. Dado ao pouco conhecimento sobre as ações das proteínas PS4 e a existência de somente uma subclasse descrita, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização da linhagem *Bacillus thuringiensis coreanensis* como potencial fonte da proteína PS4. A partir do DNA total extraído dessa linhagem, o gene *ps4* foi isolado, clonado e análises *in silico* de sua sequência foram realizadas. Nessas análises foram utilizadas ferramentas como Bioedit, BLAST, Clustal Omega, Geneious, IQ-Tree e iTOL. Para a análise estrutural da PS4 encontrada, em comparação a PS4 do banco de dados (BAD22577), foram utilizadas as ferramentas Alphafold2, Pymol e InterPro. Análises em gel de SDS-PAGE permitiram a visualização da proteína PS4 de *B.t. coreanensis* inativa e ativa, após solubilização e ativação com Proteinase K. Foram efetuados bioensaios com o inseto-praga *Spodoptera frugiperda* utilizando cultura crescida das linhagens *B.t. coreanensis*, *B.t. shandongiensis* e *B.t. kurstaki* HD-73 para testar sua efetividade como linhagem inseticida. Foram também realizadas análises morfológicas das inclusões cristalinas dessas mesmas linhagens para visualização da diferença entre seus tipos de cristais em microscopia de varredura. A análise *in silico* da sequência obtida revelou similaridade de 92,03% com a sequências de *ps4* presente no banco de dados (AB180980). Os bioensaios mostraram a atividade não inseticida da linhagem *B.t. coreanensis* frente ao inseto-praga, semelhante ao que ocorreu com *B.t. shandongiensis*, já caracterizado como portador da proteína PS4 e diferente da linhagem *B.t. kurstaki*, que apresentou um alto poder inseticida como previsto na literatura. Os estudos de modelagem das proteínas e a comparação de suas estruturas revelaram que a linhagem de *B.t. coreanensis* possui uma nova subclasse de PS4, denominada PS4Ab1, sendo importante fonte de parasporina a ser explorada em aplicações biotecnológicas.

**Palavras-chave:** Câncer, citotoxicidade, bioinformática, modelagem, filogenética

## ISOLATION AND *in silico* ANALYSIS OF NEW SUBCLASS OF PARASPORIN TYPE 4 FROM *Bacillus thuringiensis coreanensis* AND ITS POTENTIAL BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION

**ABSTRACT** - *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a Gram-positive bacterium whose strains have been studied mainly for the control of insect pests. However, recent studies indicate the presence of other proteins with no known insecticidal action. These proteins called “parasporins” (PS) have cytotoxic activity and have six classes, namely PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 and PS6. Among these, PS4 has only one described subclass, present in the *Bacillus thuringiensis shandongiensis* lineage. Given the limited knowledge about the actions of PS4 proteins and the existence of only one described subclass, the present work aimed to characterize the *Bacillus thuringiensis coreanensis* strain as a potential source of the PS4 protein. From the total DNA extracted from this strain, the *ps4* gene was isolated, cloned and *in silico* analyzes of its sequence were performed. Tools such as Bioedit, BLAST, Clustal Omega, Geneious, IQ-Tree and iTOL were used in these analyses. For the structural analysis of the PS4 found, in comparison to the PS4 in the database (BAD22577), the tools AlphaFold2, Pymol and InterPro were used. SDS-PAGE gel analyzes allowed the visualization of the PS4 inactive and active protein from *B.t. coreanensis*, after solubilization and activation with Proteinase K. Bioassays were carried out with the insect pest *Spodoptera frugiperda* using culture grown from *B.t. coreanensis*, *B.t. shandongiensis* and *B.t. kurstaki* HD-73 to test its effectiveness as an insecticidal strain. Morphological analyzes of the crystalline inclusions of these same strains were also carried out to visualize the difference between their types of crystals under scanning microscopy. *In silico* analysis of the obtained sequence revealed 92.03% similarity with the *ps4* sequences present in the database (AB180980). Bioassays showed the non-insecticidal activity of the *B.t. coreanensis* against the insect pest, similar to what happened with *B.t. shandongiensis*, already characterized as carrying the PS4 protein and different from the *B.t. kurstaki*, which presented a high insecticidal power as predicted in the literature. Protein modeling studies and comparison of their structures revealed that the *B.t. coreanensis* has a new subclass of PS4, called PS4Ab1, which is an important source of parasporin to be explored in biotechnological applications.

**Keywords:** Cancer, cytotoxicity, bioinformatics, modeling, phylogenetics.

## 1. INTRODUÇÃO

Conhecida pela sua ampla capacidade inseticida, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) apresenta cristais endotóxicos que são letais para diferentes larvas de insetos pragas. Atualmente é um organismo de grande importância agroeconômica pois é fortemente utilizada no controle de pragas agrícolas de diversas ordens como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera e Hymenoptera. Destaca-se no controle biológico de espécies como *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e vetores de doenças de importância mundial como as do gênero *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Diptera: Culicidae) (Oliveira-Santos et al., 2023).

Sendo facilmente encontrada na natureza, Bt possui uma diversidade genética muito grande e hoje a maioria das pesquisas é realizada envolvendo suas principais proteínas, Cry e Vip, ambas de caráter inseticida (Mendoza-Almanza et al., 2020; Oliveira-Santos et al., 2023).

Segundo Oliveira-Santos et al. (2023), Bt é uma bactéria considerada multifuncional e de grande poder biotecnológico, que não só se apresenta como um bioinseticida, mas também são tóxicos para ácaros, protozoários, nematóides e muitos outros invertebrados. Visto essa multifuncionalidade, atenção especial tem sido dirigida às proteínas parasporinas (PS) que diferente das outras acima citadas, possuem grande poder citotóxico e propriedades não hemolíticas (Mendoza-Almanza et al., 2020; Oliveira-Santos et al., 2023).

As parasporinas foram descobertas por pesquisadores japoneses no ano de 1999 e são conhecidas atualmente de acordo com suas estruturas e níveis de atividade, sendo classificadas em seis classes, PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 e PS6. Estas proteínas possuem citotoxicidade em células carcinogênicas humanas. Atuam principalmente no controle de células cancerígenas hepáticas (HepG2), de colo uterino (HeLa e TCS), pulmonar (A549), de colo retal (Caco – 2), em adenocarcinoma endometrial (Sawano) e em células leucêmicas (MOLT-4, HL-60 e Jurkat) (Okassov et al., 2015; Santos et al., 2022).

Nos estudos realizados sobre seus efeitos citocidas, a especificidade dos receptores para as parasporinas em células com mutações (ou mutadas) foram analisadas. Esta especificidade pode estar relacionada à super expressão dos receptores nesses tipos de células, quando comparada à expressão dos receptores

das células normais, o que levaria especificamente à morte das células tumorais (Okassov et al., 2015, Chubicka et al., 2018).

Dentre os estudos realizados acerca dessas proteínas, as mais estudadas foram as proteínas PS1 e PS3, no entanto são poucos os estudos sobre a proteína PS4 na qual apresenta somente uma subclasse descrita na linhagem *B.t. shandongiensis*. A PS4 possui uma proteína inativa de 31 a 34kDa e é ativa pela proteinase K produzindo uma proteína ativa de 25 a 28kDa (Suárez-Barrera, 2021; Santos et al., 2022; Rezae et al.; 2023), que segundo Ohba et al. (2009) é tóxica a células T leucêmicas, células de câncer de cólon e do câncer do colo do útero, atuando portanto, em alguns dos principais tipos de câncer que mais afligem a população brasileira (Santos et al., 2023).

Em um trabalho anterior realizado pelo presente grupo de pesquisa (Dos Santos et al., 2022), um fragmento de PS4 ainda não descrito foi detectado na linhagem *B.t. coreanensis*, cujo genoma completo de seu plasmídeo ST7 está sequenciado e presente no Genbank (CP016197.1). O alinhamento obtido pela ferramenta BLAST revelou uma identidade de 100% entre o fragmento encontrado no trabalho com uma proteína hipotética (ANN35810.1) desse genoma. Sendo assim, concluiu-se que o fragmento se tratava possivelmente de uma nova subclasse PS4, visto que a sequência apresenta algumas dissimilaridades entre o gene descrito como PS4 no banco de dados (AB180980) (Zhu, J. Rice Research Institute, Sichuan. Agricultural University, Huiming, Wenjiang, Sichuan 611130, China).

Em um contexto mais amplo, muito se discute sobre a hipótese da maioria das linhagens citotóxicas não apresentarem ação inseticida (Santos et al., 2022, Oliveira-Santos et al., 2023). Logo, somando-se aos resultados moleculares apontados, torna-se interessante avaliar a efetividade da linhagem *B.t. coreanensis* em bioensaios inseticidas e assim melhor afirmar sobre as suas atividades biológicas.

Tendo em vista os poucos estudos acerca da proteína PS4, tanto sobre seu efeito citotóxico, quanto seu potencial como proteína inseticida, o presente trabalho busca dar continuidade à caracterização da linhagem de *B.t. coreanensis* como potencial fonte da proteína PS4, com vista no conhecimento de sua estrutura molecular e função biológica e testar a atividade inseticida desta linhagem frente a *S.*

*frugiperda* e assim, sugerir a potencial aplicação desta linhagem, seja na agricultura ou na saúde.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Bacillus thuringiensis*: taxonomia e biologia

A espécie *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria gram-positiva, da ordem Bacillales e família Bacillaceae. A nível taxonômico, a espécie é pertencente ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*, uma subdivisão decorrente da relação filogenética, genomas e sequências do gene 16S rRNA altamente conservados compartilhados entre o gênero *Bacillus*. Também fazem parte do grupo as espécies *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* e *B. toyonensis* (Sauka et al., 2022).

A identificação e caracterização taxonômica de espécies de *B. cereus* *sl* é realizada por métodos como a sorotipagem flagelar H e/ou métodos de genotipagem, aprimorados graças às ferramentas baseadas em sequenciamento de Nova Geração (Wang et al., 2023). Até novembro de 2023, havia um total de 6.206 cepas do grupo *B. cereus* submetidas ao “Public databases for molecular typing and microbial genome diversity” (pubMLST). *Bacillus thuringiensis* apresentava 703 cepas sorovares isoladas a partir de solo e resíduos orgânicos.

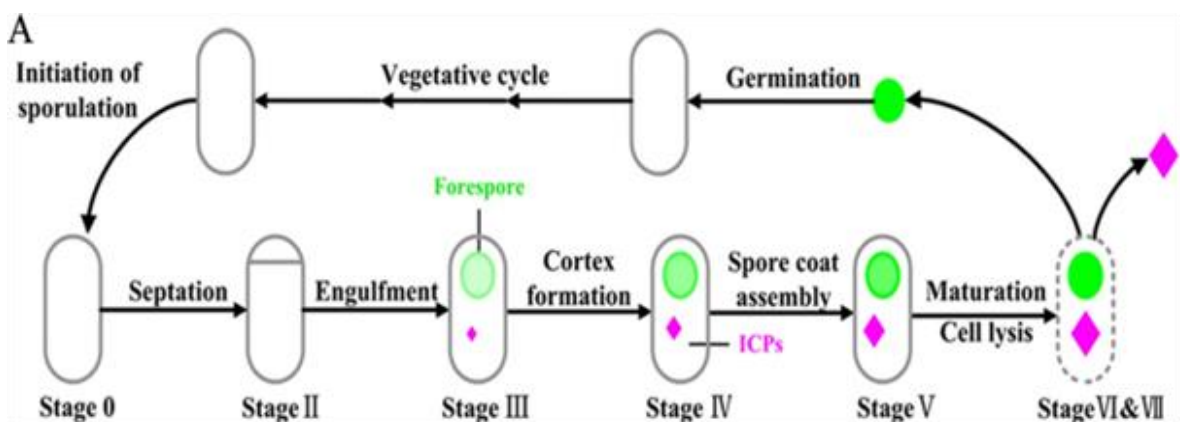
No “*Bacillus* Genetic Stock Center”, repositório que visa preservar e distribuir entre pesquisadores de todo o mundo cepas caracterizadas geneticamente, vetores de clonagem do gênero *Bacillus* e organismos relacionados, existem 191 isolados de tipo selvagem e derivados mutantes de Bt. Muitos sorovares possuem grande relevância na indústria, farmácia e agronegócio, destacando a necessidade de um sistema eficiente de tipagem e classificação de isolados (Wang et al., 2023).

*Bacillus* *sp.* são bactérias esporulantes encontradas em solo, água, ambientes orgânicos e até mesmo em locais com condições nocivas para a sobrevivência. O gênero apresenta alto potencial fermentativo, capaz de converter eficientemente fontes simples de carbono em substrato, o que faz dessas bactérias um interessante potencial biotecnológico (Qian et al., 2023).

O endósporo, formado durante o processo de esporulação, possui estrutura e composição bioquímica com multicamadas protetoras que permitem sua sobrevivência sob escassez de nutrientes, variações de pH, temperatura, nível de oxigênio, osmolaridade, radiação e exposição química (Abee et al., 2011). Portanto, condições estressantes ao ciclo de vida de algumas espécies de *Bacillus sp.* induzem a uma série de alterações morfológicas e citológicas que culminam na formação de endósporos (Gerrero, 2023).

O ciclo biológico do *B. cereus s/l* apresenta duas fases principais: a fase vegetativa e fase de esporulação. A primeira corresponde ao período em que há a multiplicação da bactéria e produção da biomassa vegetativa, com a formação de filamentos axiais (estágio 0 a I); formação de septo de foresporos e divisão celular assimétrica (estágio II); engolfamento, formação de foresporos e primeiro aparecimento de cristais parasporais (estágio III) (Figura 1) (Wang et al., 2013b; Barssoum et al., 2023).

Na fase de esporulação há a formação dos endósporos e, em algumas espécies como Bt, há a formação de cristais parasporais. Ocorre após aproximadamente 22 h de crescimento, com a montagem de córtex, capa e exosporium e desenvolvimento de cristais parasporais (estágios IV a VI). A fase finaliza com a maturação dos esporos, lise das células-mãe e liberação de esporos e cristais parasporais (estágio VII) (Wang et al., 2013b) (Figura 1).



**Figura 1:** Processo de formação de esporos em *Bacillus thuringiensis*. Ciclo biológico de *Bacillus thuringiensis* com as etapas de formação à liberação dos esporos (em

verde) e cristais parasporais (em rosa). Adaptado com permissão de Wang J, Mei H, Qian H, Tang Q, Liu X, Yu Z, He J (2013) Expression profile and regulation of spore and parasporal crystal formation-associated genes in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Proteome Research** 12:5487-550. Copyrights © (2013) American Chemical Society.

Os cristais parasporais são estruturas proteicas induzidas no início da fase de esporulação, compactadas ao longo do ciclo da bactéria e que podem representar até 25% do peso seco da célula bacteriana (Agaisse e Lereclus, 1995).

Desde níveis transcricional a pós-traducional, diversos mecanismos de regulação metabólica estão sistematicamente envolvidos para a formação dos endósporos e cristais parasporais. Estudos de transcriptômica e proteômica indicam que alguns pré-requisitos são necessários para que essas espécies de *Bacillus sp* produzam essas estruturas (Wang et al., 2013a; Guerrero, 2023).

O primeiro pré-requisito refere-se ao fornecimento de aminoácidos, que podem ser adquiridos por captação do ambiente extracelular e biossíntese intracelular. Mais de 300 genes participam do metabolismo de aminoácidos. A expressão de genes envolvidos no transporte e na biossíntese de aminoácidos é reduzida ao longo do tempo. Isso sugere que as fontes de aminoácidos destas duas vias são limitadas. Para manter os níveis de produção, proteases com atividades elevadas podem promover eficientemente a reciclagem de proteínas para atender às necessidades de aminoácidos durante a esporulação (Wang et al., 2013a).

Outra necessidade primordial para produção de níveis satisfatórios de endósporos e proteínas cristalinas refere-se às fontes de carbono e energia, visto que a demanda metabólica é alta. Moléculas de carbono intracelulares (PHB) e extracelulares (acetoína) são armazenadas na presença de meio rico em nutrientes. Em casos de esgotamento celular, essas reservas, assim como carbonos de baixa qualidade (monossacarídeos e dissacarídeos), são utilizados como fonte de energia pela bactéria (Wang et al., 2013a; Guerrero, 2023).

A produção de endósporos e das proteínas cristalinas é uma estratégia de resistência para que a bactéria sobreviva às condições adversas. Algumas proteínas cristalinas possuem ação inseticida, o que pode ter sido uma característica evolutiva

adquirida para facilitar a colonização da bactéria no intestino do inseto, garantindo o acesso a nutrientes e proteção contra estresses ambientais. Desse modo o endósporo, uma estrutura dormente altamente resistente, possibilita a sobrevivência dessas espécies em condições extremas por longos períodos (Setlow, 2016).

Durante o processo de esporulação, as proteínas cristalinas são encontradas na superfície dos esporos. Isso reduz a resistência dos esporos, porém, aumenta as propriedades inseticidas dos cristais (Du e Nickerson, 1996). O modo de ação dos cristais parasporais será tratado adiante.

## **2.2. *Bacillus thuringiensis*: Proteínas cristalinas inseticidas e modo de ação**

*Bacillus thuringiensis* possui o maior genoma do grupo *Bacillus sp.*, com 6,09575 Mb. De maneira geral, os genomas de Bt apresentam cerca de seis plasmídeos, onde diversas proteínas inseticidas cristalinas (Cry e Cyt), proteínas inseticidas vegetativas (Vip), proteínas inseticidas secretadas (Sip) e muitas outras moléculas são produzidas (Guerrero, 2023; Qian et al., 2023).

Das duas mais relevantes inclusões proteicas, denominadas Cry (“cristalina”) e Cyt (“citolítica”), foram isoladas de Bt ainda na década de 70 (Whiteley e Schnepf, 1986). Por muito tempo, a bactéria foi considerada a única espécie do grupo *B. cereus* a apresentar plasmídeos codificadores de cristais parasporais abrigados no citoplasma (Sauka et al., 2022). Entretanto, comprovou-se que estes plasmídeos podem ser adquiridos por transferência horizontal entre *B. cereus sensu stricto*, Bt e *B. anthracis*, permitindo a co-evolução de novas sorovariedades (Meric et al., 2018; Sauka et al., 2023).

A síntese e montagem das inclusões proteicas em Bt são controladas por uma série de fatores, incluindo promotores dependentes de esporulação, sequências de estabilização nas regiões 5' e 3' (“upstream” e “downstream”) dos genes e proteínas acessórias. Os promotores dependentes de esporulação são responsáveis pela transcrição dos genes *cry* e *cyt* durante a esporulação. As sequências “upstream” e “downstream” aumentam a estabilidade dos transcritos e as proteínas acessórias

ajudam na montagem dos cristais (Federici et al., 2006).

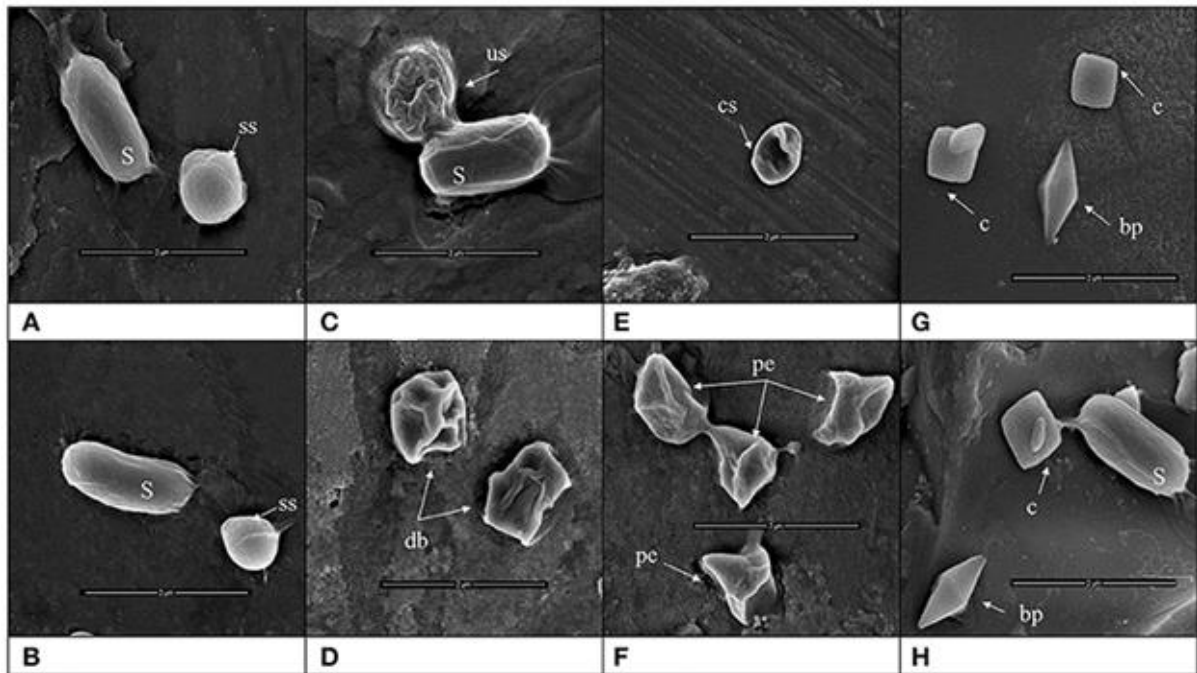
A regulação dos genes *cry* e *cyt* está associada a fatores  $\sigma$  (sigma), que são ativados sequencialmente e de maneira coordenada para regular a expressão gênica em diferentes estágios do desenvolvimento do endósporo. Dados de RNA-seq demonstram níveis elevados dos fatores  $\sigma F$ ,  $\sigma E$ ,  $\sigma G$  e  $\sigma K$  detectados na fase de crescimento exponencial (7h após o inóculo), enquanto a expressão gênica de outros fatores  $\sigma$  específicos da esporulação foi observada em níveis mais altos apenas durante a fase de crescimento estacionária (22h após o inóculo). Portanto, tais fatores foram associados à transcrição de genes codificadores de proteínas inseticidas para o desenvolvimento de cristais parasporais (Wang et al., 2013b).

As inclusões Cry e Cyt são produzidas dentro do seu próprio compartimento e são conectadas por uma matriz fibrosa multilaminar, composta principalmente por proteínas únicas que são sintetizadas pela bactéria (Rudd et al., 2023). Sugere-se um mecanismo onde a transcrição, a tradução e a inserção estão fortemente ligadas à RNA polimerase, aos ribossomos e ao *translocon* do compartimento da membrana lipídica. Neste processo, múltiplos ribossomos se ligam a uma única molécula de mRNA que codifica um polipeptídeo que se associa à membrana do compartimento. À medida que o polipeptídeo é sintetizado, ele é simultaneamente inserido através da membrana e sofre dobramento ao entrar no compartimento conectado (Rudd et al., 2023).

Concentrações elevadas da mesma proteína em compartimentos específicos da proteína inseticida podem favorecer sua cristalização (Rudd et al., 2023). Esses cristais são estabilizados por interações intermoleculares covalentes e não covalentes, como ligações dissulfeto de cisteinila (Kojima et al., 2022). Portanto, o modo de montagem dos cristais parasporais varia com o tipo de proteína inseticida codificada. Proteínas inseticidas de tamanho maior (~130 kDa) podem formar cristais parasporais por automontagem, enquanto proteínas inseticidas de tamanho menor (71 kDa ou menos) requerem proteínas acessórias para montagem de cristais parasporais (Wang et al., 2013b).

O formato das inclusões cristalinas é determinado por uma combinação de fatores genéticos e moleculares (Federici et al., 2006). Dentro de um mesmo serovar

é possível observar variações no tamanho e no formato (piramidal, esférico, cúbicos, etc.) dessas estruturas (Figura 2). Entretanto, cada família de Cry possui um padrão distintivo e uma gama de atividades específicas. As proteínas da família Cry1 cristalizam em forma bipiramidal e demonstram eficácia contra larvas de lepidópteros, ao passo que o Cry4 cristaliza em formato esférico e apresenta toxicidade para larvas de dípteros, por exemplo (Loutfi et al., 2021).



**Figura 2:** Microscopia eletrônica de varredura dos diferentes tipos de morfologias de cristais e esporos (S) de *Bacillus thuringiensis*. A e B: Cristal esférico liso (ss); C: Cristal esférico com superfície ondulada; D: esférico, mas de balão vazio (db); E: Cristais esféricos com superfície côncava (cs); F: cristais esféricos com bordas pontiagudas (pe); G e H: Cristais bipiramidais (bp) e cuboides (c). Adaptado de Nair K, Al-Thani R, Al-Thani D, Al-Yafei F, Ahmed T, Jaoua S (2018) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology,  $\delta$ -endotoxins and cry gene content. **Frontiers in microbiology** 9:708. Copyrights © (2018) autores e publicado pela Frontiers in microbiology.

Proteínas inseticidas de origem bacteriana podem ser consultadas no BPPRC (“*Bacillus thuringiensis* Pesticidal Protein Characterization Resource”), banco de dados que classifica as proteínas segundo a homologia das sequências de aminoácidos, compartilhamento de estruturas e domínios proteicos conservados em

comum e atividade biológica (Crickmore et al., 2021). As proteínas Cry apresentam 760 membros classificados em famílias de Cry1 a Cry79. As proteínas Cyt possuem 44 membros distribuídos em oito famílias.

O domínio proteico é uma região específica de uma proteína que possui uma estrutura e função próprias. Proteínas Cry e Cyt apresentam três (*pfam03945*, *pfam00555* e *cd04085*) e um (*pfam01338*) domínios em sua forma ativa, respectivamente (Crickmore et al., 2021). Esses domínios apresentam funções essenciais no modo de ação das proteínas no inseto.

Uma vez que a célula-mãe é lisada, o esporo e a inclusão proteica são liberados para o ambiente. Se ingeridas por um inseto suscetível, as proteínas Cry e Cyt serão solubilizadas e ativadas por proteases alcalinas presentes no intestino do inseto. Os domínios proteicos serão responsáveis para que sucessivas etapas de processamento das proteínas sejam realizadas: nas proteínas Cry, há a interação com receptores da membrana apical do intestino médio do inseto; já a proteína Cyt interage como um detergente nos fosfolipídios insaturados da membrana. Essas proteínas atuam em sinergia, desencadeando poros e instabilidade no intestino do inseto, causando a mortalidade do hospedeiro por inanição. Além disso, o cadáver do inseto torna-se um ambiente favorável para que os esporos de Bt possam se desenvolver (Bravo et al., 2007; Bravo et al., 2013; Loutfi et al., 2021; Šolinc et al., 2023).

Proteínas Bt agem de forma específica no hospedeiro, uma vez que é dependente de enzimas proteolíticas e/ou receptores específicos presentes na espécie. Visto a eficiência e a segurança das proteínas Bt como bioinseticida, a bactéria foi amplamente utilizada como ingrediente ativo em formulações para controle de inseto-praga na agricultura. Os três inseticidas bacterianos comerciais mais importantes são todos derivados de subespécies de Bt (Bt subsp. *kurstaki*, subsp. *aizawai* e subsp. *israelenses*). Embora somente Bt subsp. *israelenses* seja usado em insetos da ordem Diptera e os demais produtos tenham como alvo insetos pertencentes à ordem Lepidoptera, ambas as formulações possuem modo de ação semelhante (Rudd et al., 2023).

A relevância das proteínas parasporais ampliaram seu uso biotecnológico,

propiciando diversas plantas geneticamente modificadas com genes de Bt. No Brasil, Bt está presente em quase 70 eventos transgênicos distribuídos entre culturas de milho, soja, algodão e cana-de-açúcar (CTNBIO, 2023).

Além de genes *cry*, genes *vip* também ganharam muita importância, sendo explorados na obtenção de plantas transgênicas. Embora as diferenças quanto a estrutura e composição proteica, proteínas Cry e Vip são dependentes das proteases do hospedeiro e receptores específicos para ativação e indução à mortalidade após a ingestão pelo inseto (Jiang et al., 2023).

### **2.3. Características gerais das parasporinas**

Embora as proteínas de Bt possuam popularidade graças às proteínas Cry, Cyt e Vip e seus efeitos inseticidas em importantes pragas agrícolas e urbanas, *in situ* a ocorrência de isolados com proteínas não entomopatogênicas prevalece em maior número (Ohba e Aizawa, 1986; Chubicka et al., 2018).

A exploração das atividades biológicas de Bt levaram a constatar toxicidade de cepas em dezenas de invertebrados, como protozoários, nematoides e ácaros, além de ser um eficiente biofertilizante do solo, promotor de crescimento e indutor de tolerância a estresses abióticos em plantas (Oliveira-Santos et al., 2023).

Sob outra perspectiva, a potencialidade farmacológica de Bt tem recebido bastante notoriedade. Embora as proteínas Cyt não sejam dependentes de receptores específicos em seu modo de ação, essas moléculas apresentam ação hemolítica, ou seja, são capazes de causar a destruição dos eritrócitos sanguíneos, levando à ruptura dessas células. A citotoxicidade pode afetar diversos hospedeiros, incluindo os mamíferos (Gill e Hornung, 1986; Bravo et al., 2007).

Em estudos conduzidos para explorar a atividade de Bt em células MOLT-4 (células leucêmicas humanas), algumas proteínas não cristalinas apresentaram efeito citocida. Entretanto não houve atividade hemolítica tal como observado em proteínas Cyt. Essas proteínas desencadearam diferentes espectros de toxicidade e comprovaram sua capacidade de matar preferencialmente células cancerígenas, recebendo a denominação de parasporinas (Mizuki et al., 1999; Mizuki et al., 2000;

Katayama et al., 2005).

Inicialmente, as parasporinas foram nomeadas como proteínas Cry, embora fossem proteínas de inclusão parasporal não inseticidas e as sequências de aminoácidos de ambas apresentam apenas 25% de similaridade (Ohba et al., 2009). Tais moléculas seguiram a nomenclatura proposta por Crickmore et al. (1998). A denominação “parasporina” foi divulgada a partir de 2006, após a formação do “Committee of Parasporin Classification and Nomenclature” (CPCN). O comitê ainda é responsável pelo sistema de nomenclatura das proteínas parasporais bacterianas não hemolíticas porém, com capacidade seletiva de eliminar células cancerígenas.

Atualmente são apresentadas 19 parasporinas categorizadas em seis classes (PS1-PS6) (Tabela 1). A classificação é realizada pelo CPCN de acordo com o sistema de nomenclatura de classificação quaternária baseado na identidade entre as sequências de aminoácidos (Ohba et al., 2009). Mesmo não apresentando espectro inseticida, a atual nomenclatura de proteínas Bt lista as parasporinas devido ao conjunto significativo de pesquisas publicadas sobre essas proteínas (Crickmore et al., 2021).

**Tabela 1:** Parasporinas de *Bacillus thuringiensis* e algumas características. Adaptado de Mendoza-Almanza, Gretel et al. (2020) The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. **Toxins**, v. 12, n. 5, p. 301. Copyrights © (2020) autores e publicado pela Toxins.

Parasporina	Gene Cry	Proteína não-ativada (kDa)	Proteína ativada (kDa)	Enzima proteolítica	Mecanismo de ação
PS1Aa1	Cry31Aa1	81	15; 56	Tripsina	Apoptose
PS1Aa2	Cry31Aa2	83	55; 70	Tripsina	Não informado
PS1Aa3	Cry31Aa3	81	56	Tripsina	Não informado
PS1Aa4	Cry31Aa4	81	Não informado	Proteinase K	Não informado
PS1Aa5	Cry31Aa5	81	Não informado	Proteinase K	Não informado
PS1Aa6	Cry31Aa6	70	15; 55	Tripsina	Não informado
PS1Ab1	Cry31Ab1	82	56	Tripsina	Não informado
PS1Ab2	Cry31Ab2	82	Não informado	Proteinase K	Não informado
PS1Ac1	Cry31Ac1	87	Não informado	Proteinase K	Apoptose
PS1Ac2	Cry31Ac2	81	15; 60	Proteinase K	Não informado
PS1Ad1	Cry31Ad1	73	14; 59	Tripsina	Não informado

PS2Aa1	Cry46Aa1	37	30	Proteinase K	Formação de poros
PS2Aa2	Cry31Aa2	30	28	Proteinase K	Não informado
PS2Ab1	Cry31Ab1	33	29	Proteinase K	Não informado
PS3Aa1	Cry41Aa1	88	64	Proteinase K	Não informado
PS3Ab1	Cry41Ab1	88	64	Proteinase K	Não informado
PS4Aa1	Cry45Aa1	31	28	Proteinase K	Formação de poros
PS5Aa1	Cry64Aa1	33	30	Proteinase K	Não informado
PS6Aa1	Cry63Aa1	85	14,59	Tripsina	Não informado

Os nomes antigos e atuais podem ser consultados no BPPRC, onde Cry31Aa1 corresponde à atual parasporina 1, Cry46Aa1 tornou-se parasporina 2 ou Mpp46Aa1, Cry41Aa1 tornou-se a parasporina 3, Cry45Ba1 refere-se à parasporina 4 ou Mpp45Ba1, Cry64Aa1 corresponde à parasporina 5 ou Mpp64Aa1 e Cry63Aa1 refere-se à parasporina 6 (Crickmore et al., 2021).

Embora os membros das seis classes parasporinas variem em estruturas e modos de ação (Inouye et al., 2008), o efeito citolítico da maioria destas proteínas é mediado por receptores específicos na membrana plasmática das células suscetíveis. A toxicidade direcionada das parasporinas para as células cancerígenas pode ser atribuída à superexpressão de seus receptores moleculares alvo em comparação com as células normais. Conseqüentemente, a proteína é capaz de identificar seletivamente as células transformadas, eliminando-as eficientemente (Ohba et al., 2009; Saitoh et al., 2006).

Assim como as proteínas Cry e Cyt, algumas parasporinas requerem ativação proteolítica no seu modo de ação. Enzimas como tripsina ou proteinase-K presentes no microambiente tumoral ou no sistema digestivo podem exercer essa função. Algumas parasporinas são reduzidas a dois fragmentos que permanecem associados durante o modo de ação. Os processos de clivagem proteolítica podem variar dependendo da parasporina específica e do tipo de célula-alvo (Tabela 1) (Ohba et al., 2009; Mendoza-Almanza et al., 2020)

Em relação à estrutura, as parasporinas são caracterizadas em um grupo de maior peso molecular e outro de menor peso molecular. Proteínas formadora de poro  $\alpha$  do tipo três domínios ( $\alpha$ -PFTs), proteína formadora de poros  $\beta$  do tipo Cyt (Cyt  $\beta$ -PFT) compõem o grupo de maior peso molecular (Xu et al., 2014).

Semelhante às proteínas Cry, essas proteínas possuem cinco blocos altamente conservados e três domínios estruturais distintos. Esses domínios são atribuídos à função de ligação ao receptor, formação de poros na membrana celular e atividade citotóxica (de Maagd et al., 2003). Essas proteínas, que correspondem à PS1, PS3 e PS6, apresentam aproximadamente 80 kDa e após o processamento e ativação por proteases possuem massa molecular de 60–70 kDa (Xu et al., 2014; Akiba e Okumura, 2017; Suárez-Barrera et al., 2021).

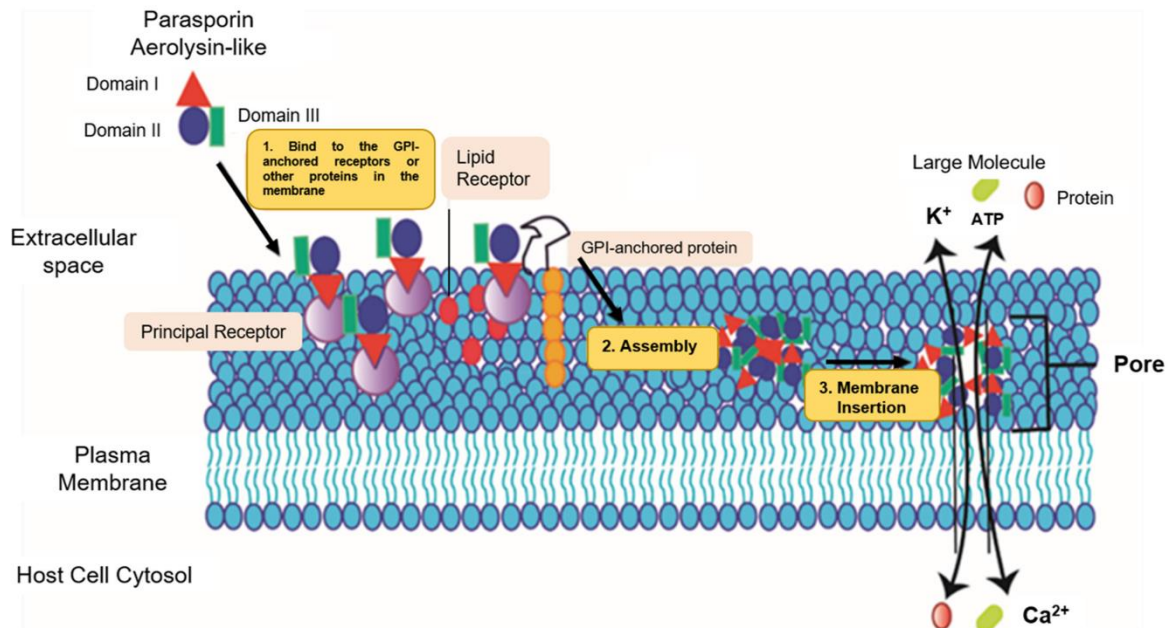
O grupo de menor peso molecular são as parasporinas do tipo aerolisina  $\beta$ -PFTs. Os membros possuem proteínas do tipo aerolisina, épsilon, citolisina dependente de colesterol,  $\alpha$ -hemolisina, entre outras com características estruturais semelhantes. Elas atuam como citolisinas por meio da formação de poros transmembranares do tipo barril- $\beta$  após se ligarem a receptores ancorados no Glicosilfosfatidilinositol (GPI) da membrana da célula alvo (Xu et al., 2014; Suárez-Barrera et al., 2021) (Figura 3). Constituem o grupo as proteínas PS2, PS4 e P5, que quando nativas possuem 31–37 kDa e, quando ativadas, de 27–30 kDa (Akiba e Okumura, 2017; Suárez-Barrera et al., 2021).

Após a ligação aos receptores, as parasporinas são internalizadas pelas células cancerígenas. Uma vez no interior da célula, essas proteínas oligomerizam-se, podendo formar poros na membrana celular. Esse processo leva à perturbação da integridade da membrana, resultando em um desequilíbrio iônico ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ) e na liberação de moléculas intracelulares importantes (como o ATP), promovendo a morte celular (Xu et al., 2014; Akiba e Okumura, 2017; Girija et al. 2023) (Figura 3).

Nesse modelo, o domínio I das parasporinas está associado à ligação da proteína à membrana da célula, enquanto o domínio III desempenha um papel na formação de poros, formando uma alça transmembrana. O domínio II está envolvido na interação entre os monômeros individuais no oligômero e é essencial para a toxicidade das parasporinas contra as células cancerígenas (Suárez-Barrera et al., 2021) (Figura 3).

Outro modelo de ação de parasporinas proposto na literatura é o de indução à apoptose celular. Após as parasporinas se ligarem aos receptores específicos nas células cancerígenas, inicia-se cascatas de sinalização intracelular que resultam na

ativação de proteínas regulatórias pró-apoptóticas e na inibição de proteínas antiapoptóticas. A apoptose é um processo controlado que causa a morte ordenada da célula, com fragmentação do DNA, formação de corpos apoptóticos e posterior remoção pelos macrófagos, sem causar inflamação (Mendoza-Almanza et al., 2020).



**Figura 3:** Formação de poros das parasporinas no modo mediado por aerolisina (PS2Aa). 1: Ligação dos receptores ancorados no GPI da membrana da célula alvo no N-terminal da parasporina solubilizada; 2: Ativação proteolítica no C-terminal. Em seguida os monômeros proteicos oligomerizam-se; 3: Reorganização dos monômeros e formação de uma transmembrana de barril- $\beta$ , onde há um desequilíbrio iônico. Adaptado de Mendoza-Almanza, Gretel et al. (2020) The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. **Toxins**, v. 12, n. 5, p. 301. Copyrights © (2020) autores e publicado pela Toxins.

#### 2.4. Potenciais aplicações biotecnológicas das parasporinas

O câncer é um dos problemas de saúde pública mais alarmante do mundo. Apenas no Brasil são estimadas as ocorrências para 21 tipos de câncer. O câncer de pele não melanoma é o tipo mais comum no país e estima-se 625 mil novos casos da doença entre 2023 e 2025. Atualmente, o câncer de pele não melanoma corresponde a 33,3% da incidência dos casos, seguido pelo câncer de mama feminina (10,5%), o de próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (de

Oliveira et al., 2023).

Atualmente o tratamento de câncer no Brasil é realizado por cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea. Na maioria dos casos é necessário combinar mais de uma modalidade (Brasil, 2022). A perspectiva por um tratamento alternativo aos métodos tradicionais, que seja eficaz e com efeitos colaterais menos agressivos ao paciente é um desafio (Aboul-Soud et al., 2019).

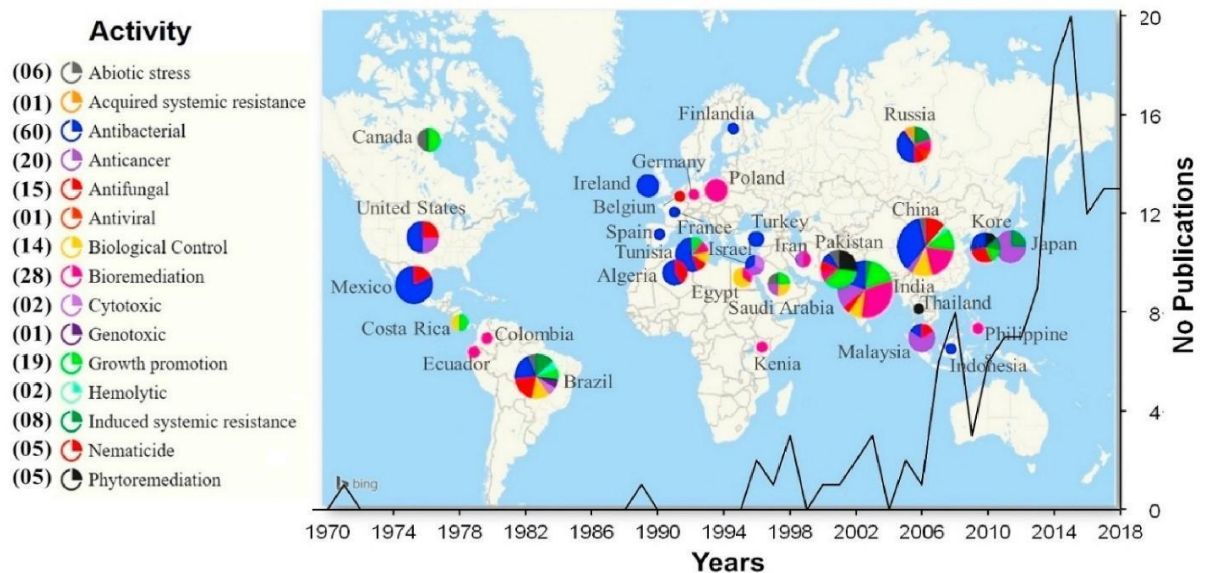
Dentre as aplicações das parasporinas, as pesquisas que mais se destacam são as focadas na toxicidade de células cancerígenas em mamíferos. De maneira geral, o isolamento das parasporinas é feito após a identificação de cepas de Bt que não possuem atividade inseticida (Katayama et al., 2005). Conforme a Tabela 2, todas as classes de parasporinas foram testadas em alguma linhagem de célula tumoral (Santos et al., 2022).

**Tabela 2:** Citotoxicidade das seis classes de parasporinas em diferentes linhagens de células. Os valores representam a concentração letal (LC50) em µg/mL. As melhores doses foram destacadas. Adaptado de Santos, Edclécia N. et al. (2022) *Bacillus thuringiensis: From biopesticides to anticancer agents. Biochimie*, v. 192, p. 83-90. Copyrights © (2021) Elsevier B.V. e Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire.

Linhagem de células	PS1	PS2	PS3	PS4	PS5	PS6
MOLT-4 (Leucemia)	2,2	<b>0,022</b>	>10	0,472	<b>0,0075</b>	ND
Jurkat (Leucemia)	>10	<b>0,018</b>	>10	>2	<b>0,124</b>	ND
HL-60 (Leucemia)	<b>0,32</b>	<b>0,019</b>	1,32	0,725	1,079	ND
U937 DE-4 (Leucemia)	ND	ND	ND	0,980	>10	ND
K562 (Leucemia)	ND	ND	ND	>2	4,249	ND
HepG2 (Câncer de fígado)	3,0	<b>0,019</b>	2,8	1,90	<b>0,049</b>	2,3
HeLa (Câncer cervical)	<b>0,12</b>	2,5	>10	>2	<b>0,08</b>	7,2
Sawano (Câncer endometrial)	>10	<b>0,0017</b>	>10	<b>0,245</b>	<b>0,065</b>	ND
TCS (Câncer cervical)	ND	>2	>10	0,719	<b>0,046</b>	ND
Caco-2 (Câncer de cólon)	>10	<b>0,013</b>	>10	<b>0,124</b>	0,30	>10
A549 (Câncer de pulmão)	>10	>10	>10	>2	>2	ND
T (Células normais)	>10	0,14	>10	>2	ND	ND
HC (Células normais de hepatócitos)	>10	1,1	>10	>2	>10	>10
(UtSMC (Células uterinas normais)	>10	>2	>10	>2	0,,223	ND
MRC-5 (Células pulmonares normais)	>10	>2	>10	>2	0,273	ND

ND: Não determinado

Em um levantamento sobre atividades não inseticidas de Bt, um total de 140 artigos publicados foram selecionados, onde foram destacadas 15 atividades alternativas ao controle de insetos, distribuídas entre as áreas da saúde (56,6%), agricultura (25,6%) e meio ambiente. Destas atividades, um dos maiores números de experimentos publicados foi relacionado às funções anticancerígenas de Bt. A atividade foi explorada principalmente no Japão, Malásia e Índia e apresentaram maior relevância entre as publicações (Figura 4) (Oliveira-Santos et al., 2023).



**Figura 4:** Atividades não inseticidas publicadas em revistas científicas. A distribuição global dos artigos publicados de acordo com a atividade está representada no mapa, enquanto o gráfico aponta o número de publicações por ano. À esquerda estão o número de testes e a atividade não inseticida de *Bacillus thuringiensis*. Cada atividade está representada por uma cor e foram distribuídas por local de estudo nos gráficos circulares. Adaptado de Oliveira-Santos, Naiane et al. (2023) More than just an insect killer: The non-insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* with biotechnological potential. *Toxicon*, p. 107261. Copyrights © (2023) Elsevier Ltd.

## 2.5. PS1

A classe PS1 possui 11 membros e foi a primeira parasporina a ser descoberta (Mizuki et al., 2000). Apresentam cerca de 70 a 83 kDa e a maioria das proteínas da

classe são ativadas por tripsina, desencadeando geralmente dois subprodutos de 15 e 55-70 kDa mantidos associados durante a atividade citolítica (Mizuki et al., 1999).

PS1s possui tridomínio semelhante às toxinas Cry. Entretanto a capacidade de induzir a apoptose, principalmente o influxo de  $Ca^{2+}$ , tem sido um dos principais mecanismos observados como atividade citotóxica seletiva de PS1s contra células cancerígenas (Xu et al., 2014).

Dentre as linhagens cancerígenas testadas *in vitro*, células cancerosas do colo do útero (HeLa), leucemia linfoblástica humana (MOLT-4), leucemia mieloide aguda (HL-60) e hepatoma humano (HepG2) foram avaliadas e obtiveram citotoxicidade confirmada (Tabela 2). Todas essas células possuem o beclin-1 extracelularmente, sugerido nas revisões como o principal receptor de membrana das PS1s (Mendoza-Almanza et al., 2020; Santos et al., 2022).

## 2.6. PS2

A classe PS2 possui três membros e é uma das parasporinas com maior espectro citolítico, com melhores doses letais (Tabela 2) (Santos et al., 2022). Apresentam estrutura de baixo peso molecular, com 30 a 37 kDa. A ativação é realizada após tratamento com proteinase K, sendo clivadas em um produto único de 28-30 kDa (Mendoza-Almanza et al., 2020).

PS2s são consideradas parasporinas formadoras de poros e indutoras de morte celular por necrose (Santos et al., 2022). A permeabilização nas células é realizada após o reconhecimento dos GPIs como receptores. Quando a toxina é concentrada e oligomerizada, formam-se poros transmembrana, causando danos à sua permeabilidade (Kitada et al., 2009). Testes com as linhagens celulares de melanoma humano (Sawano), leucemia linfoblástica aguda (Jurkart), MOLT-4, HL-60 e HepG2 apresentaram citotoxicidade (Tabela 2) (Santos et al., 2022).

A exposição das células à PS2s induziu ao encolhimento celular; formação de corpos apoptóticos; fragmentação do DNA; formação das bolhas na superfície da membrana celular; alteração para uma forma mais arredondada ou irregular à medida que passam pelo processo de morte celular e; redução da capacidade das células

cancerígenas se manterem conectadas uma às outras (Xu et al., 2014; Mendoza-Almanza et al., 2020).

### **2.7. PS3**

A classe PS3 possui dois membros e é uma das parasporinas com maior estrutura mesmo após o processamento proteolítico realizado com proteinase K (64 kDa) (Tabela 1). Apresenta três domínios e o modo de ação é semelhante a PS2s. Efeitos citotóxicos foram verificados em linhas celulares HL-60 e HepG2 (Suárez-Barrera et al., 2021; Santos et al., 2022).

PS3 é o grupo com maior semelhança em relação às proteínas Cry. Um fato interessante é que PS3 possui um domínio ricina, cuja funcionalidade pode estar associada à ligação em carboidratos (Krishnan et al., 2017). O mecanismo das PS3s é desconhecido, visto o espectro reduzido até então publicado (Tabela 2).

Alguns efeitos citolíticos citados são o desequilíbrio no ATP, o aumento do tamanho celular e danos à membrana (Ohba et al., 2009; Souissi et al., 2022). Uma mutação em regiões essenciais para a atividade de formação de poros impediu um mutante PS3 de induzir a resposta citolítica em células HepG2. Portanto, sugere-se que PS3s causa a formação de poros na membrana das células. Esses poros têm um diâmetro estimado de menos de 1 nm e podem desencadear respostas celulares, incluindo a liberação de microvesículas e a ativação da fosforilação (Souissi et al., 2022).

### **2.8. PS4**

A classe PS4 possui um membro no seu grupo e é uma das parasporinas com menor peso molecular. Após o processamento proteolítico mediado por proteinase K, o produto geralmente possui cerca de 28 kDa (Tabela 1). PS4 é uma proteína formadora de poros  $\beta$  do tipo aerolisina, a única parasporina capaz de manter sua atividade citotóxica estável em condições ácidas e básicas de pH (Okumura et al., 2014; Mendoza-Almanza et al., 2020).

A parasporina-4 se liga de forma inespecífica à membrana plasmática, formando um complexo oligomérico de poros nas células-alvo. Durante esse processo, o reconhecimento do sítio de ligação não é dependente de colesterol, tal como a PS2 (Xu et al., 2014). A ligação inespecífica à membrana, liberação de lactato desidrogenase (LDH) e a entrada na célula de dextranos com diferentes pesos moleculares sugere um modo de ação mediado por necrose (Mendoza-Almanza et al., 2020).

A parasporina também apresentou citotoxicidade em linhagens do câncer de colo do útero humano (TCS), MOLT-4, HL-60, HepH2, Caco-2 e Sawano (Xu et al., 2014). PS4 foi a única parasporina estudada em sistema *in vivo*. Após a injeção da PS4 como tratamento de camundongos observou-se comprometimento da função renal causado por necrose no túbulo renal proximal do rim. Em ingestão oral, a parasporina pode ser solubilizada e ativada no trato digestivo de camundongos em condições ácidas. A atividade citotóxica é retida no estômago e no intestino delgado, com ausência de risco grave à saúde, sem nenhuma diferença significativa nas alterações do peso corporal em comparação com o controle (Okumura et al., 2014).

## 2.9. PS5 e PS6

As classes PS5 e PS6 possui um membro em cada grupo. A proteína PS5 não possui similaridade significativa com as proteínas Cry ou Cyt de Bt, enquanto PS6 apresenta as sequências conservadas de cinco blocos (Suárez-Barrera et al., 2021).

A parasporina PS5 apresenta 19% de homologia com o PS4Aa1 e suas características permitem incluí-las no grupo  $\beta$ -PFT do tipo aerolisina. PS5 apresenta 33 kDa e após o processamento com proteinase K é reduzida para 30 kDa. A dependência por receptores lipídicos foi ressaltada para que a PS5 exercesse citotoxicidade, entretanto, pouco se sabe sobre o modo de ação (Ekino et al., 2014). Linhagens de MOLT-4, Caco-2 HepG2, TCS, HeLa e Sawano foram testadas com PS5.

Células Hepg2 tratadas com PS6 ativada com proteinase K desencadearam o inchaço e a formação de vacúolos no citoplasma das células sensíveis (Nagamatsu et

al., 2010). PS6 também foi exposta a HeLa e Caco-2 (Tabela 2). E embora tenham sido testadas em linhagens celulares, ainda não se sabe a respeito do modo de ação dessa parasporina (Mendoza-Almanza et al., 2020).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal FCAV/UNESP, nas dependências do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada – LGBBA, situado no Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, sob a supervisão da Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério.

#### **3.1. Cultivo bacteriano para extração de DNA total**

A linhagem de *Bacillus thuringiensis* (Bt) utilizada neste trabalho consistiu na linhagem padrão *B.t. coreanensis*, retirada do banco de isolados do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada – LGBBA, situado no Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal FCAV/UNESP, São Paulo, Brasil. O estoque é mantido à temperatura ambiente, onde papel filtro impregnado com esporos de *B.t. coreanensis* é suspenso em água deionizada estéril. O volume de 1 µl da suspensão de esporos foi estriado em placas de Petri contendo meio de cultura sólido BHI “Brain Heart Infusion Broth” (Himedia), e acondicionada em estufa a 30°C por pelo menos 16h.

#### **3.2. Extração de DNA total de *Bacillus thuringiensis coreanensis***

O DNA total da linhagem de Bt foi extraído pelo método de extração rápida descrito por Bravo et al. (1998), com as seguintes modificações: Partindo do crescimento da bactéria em placa de meio BHI-ágar por 16h, a retirada de uma colônia foi feita com uma alça de cromo-níquel e adicionada a 200µL de água deionizada estéril em tubo de polipropileno de 1,5 mL. O tubo foi posteriormente colocado em freezer -80°C por 20 minutos. Após o congelamento, o tubo foi colocado em banho

seco a 100°C por 10 minutos para a lise das células. Em seguida ao choque térmico, as células foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante final contendo o material genético transferido para um tubo novo de microcentrífuga e armazenado a -20 °C até a sua utilização. A quantificação do material proveniente da extração foi realizada no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®), mensurando-se a absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a concentração de DNA determinada pela absorbância a 260 nm e a relação 260/280 nm calculada segundo Sambrook & Russel (2001) para se determinar a qualidade da amostra de DNA.

### 3.3. Isolamento do gene *ps4* por PCR

O gene *ps4* completo foi isolado a partir do DNA extraído da linhagem previamente selecionada utilizando-se o par de iniciadores PS4F (5'-GGTGGATCATATGGCGATTA -3') e PS4R (5'-CTACTGAAGAGATACAACTGGATCAAAG - 3') os quais foram elaborados com base na sequência de um gene hipotético de *Bt* do banco de dados GenBank sob número de acesso CP016197.1:47747-48574.

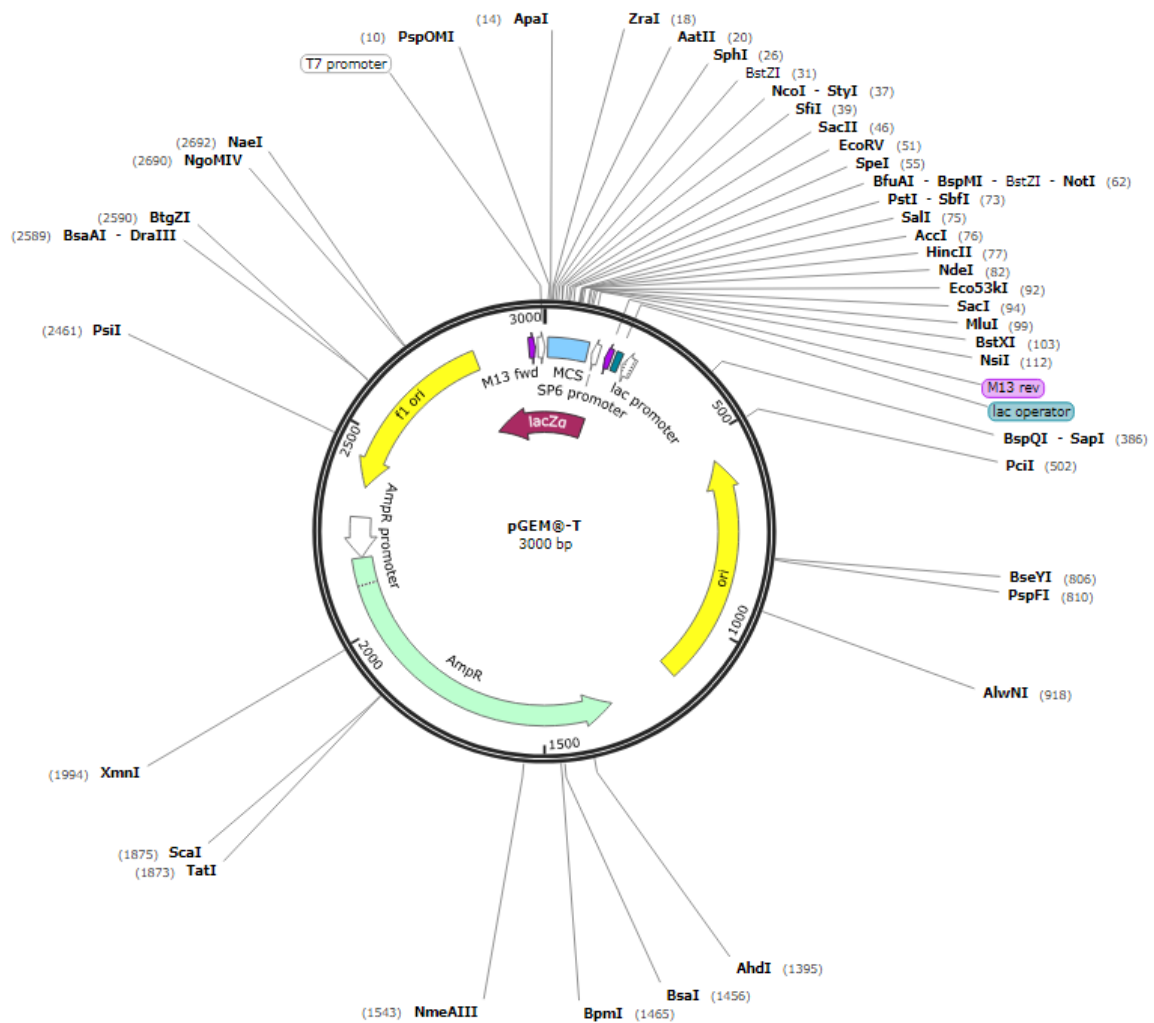
Os componentes da reação de amplificação foram 200 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada iniciador (“forward” e “reverse”), 10 mM de dNTPs, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 U de Taq Polimerase em tampão apropriado para a reação. As condições de amplificação foram desnaturação inicial a 72°C por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 72°C por 1 min, pareamento a 59°C por 1 min, extensão a 94°C por 1 min e ao final dos ciclos uma extensão a 94°C por 10 min. A amostra foi visualizada e analisada em gel de agarose 1% por eletroforese horizontal.

A amostra foi visualizada e analisada em gel de agarose 1%, utilizando-se de 5µL do produto da PCR e 3 µL de tampão de carregamento (Tris – HCl 0,1M, pH 6,8; azul de bromofenol a 0,02%; glicerol 50%). O gel, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL) foi submetido à eletroforese horizontal a 80 V por 2h, conduzida em tampão TEB (Tris 0,4 M, EDTA 0,1M, Borato 0,01 M, pH 8,3), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). O fragmento amplificado foi comparado com o marcador de tamanho molecular “1kb DNA ladder” (Fermentas). O gel de agarose foi visualizado sob fonte

de luz U.V e registrados por meio de um sistema de fotodocumentação digital em equipamento GEL DOC 2000 (BioRad), por meio do programa “Quantity-One”.

### **3.4. Clonagem do gene ps4 de *Bacillus thuringiensis coreanensis***

O produto da PCR obtido anteriormente foi purificado e clonado para confirmação da identidade gênica por sequenciamento. A purificação do produto foi feita por meio do kit “QIAquick PCR Purification Kits” (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria pelo aparelho Nanodrop (“ThermoScientific”®) e a integridade foi analisada em gel de agarose a 1%. Após o procedimento de purificação, o *amplicon* foi clonado utilizando o vetor “pGEM T-Easy” (Promega) (Figura 5), um sistema de clonagem compatível com todas as cepas de *Escherichia coli* comuns de laboratório. Para clonar o produto de PCR com extremidades 3' A geradas pela TaqDNA polimerase, as indicações do fabricante conforme descrito no “Sticky – End Cloning Protocol” foram seguidas. As células de *E. coli* DH10B competentes foram utilizadas para a transformação por meio do método de choque térmico (Sambrook & Russel, 2001) e selecionadas em placas de LB 2x (10 g de triptona/L, 5 g de extrato de levedura/L e 5 g de NaCl/L, adicionada de 1,5 % de ágar), contendo 100 µg ampicilina/mL.



**Figura 5:** Mapa do vetor pGEM T-Easy (Promega). Fonte: ([https://www.snapgene.com/plasmids/basic\\_cloning\\_vectors/pGEM-T](https://www.snapgene.com/plasmids/basic_cloning_vectors/pGEM-T))

Os clones transformantes obtidos foram transferidos individualmente para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina e as células foram multiplicadas a 37°C por 12h sob agitação constante de 200 rpm. Após o período de multiplicação das células, 3 mL da cultura foi utilizada para a extração do DNA plasmidial por meio da lise alcalina com SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) segundo Sambrook e Russel (2001). Posteriormente, a cultura restante referente a clones positivos foram alíquotadas em 700 µl e assepticamente estocadas em glicerol (100%) estéril, sendo mantidas em ultra-freezer a -80°C. O DNA plasmidial obtido foi quantificado em espectrofotômetro e posteriormente armazenado a -20°C

até os testes de confirmação dos clones contendo o gene *ps4*.

### **3.5. Confirmação dos clones contendo o gene *ps4* por PCR e sequenciamento da amostra**

O DNA plasmidial dos clones foi utilizado em reações de PCR com o iniciador direto específico do gene *ps4*. O vetor “pGEM T-Easy” contém um sítio de clonagem múltipla expandido, bem como um promotor T7 para a transcrição *in vitro*. Portanto, para amplificação do clone foi utilizado como iniciador reverso, o “T7 reverse”, que é próprio do vetor “pGEM T-Easy” permitindo visualizar presença ou ausência do inserto através do produto amplificado e verificando se o gene está clonado na fase de leitura correta do promotor. As reações e os ciclos utilizados foram os mesmos utilizados anteriormente para isolamento do gene, optando pelo uso da “GoTaq® Green Master Mix” (Promega) e 2 µl de DNA plasmidial a 100ng/µl. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos a eletroforese por ~2h, sob voltagem de 80 V. Após a visualização em luz U.V., a amostra com *amplicon* confirmado foi purificada novamente com o kit “QIAquick PCR Purification Kits” (QIAGEN), quantificada por espectrofotometria pelo aparelho Nanodrop (“ThermoScientific”®), visualizada em gel de agarose a 1% e após foi encaminhada para a confirmação por sequenciamento.

O sequenciamento das amostras foi feito pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), sediado na UNESP – Câmpus de Jaboticabal, sendo utilizado o sequenciador automático de primeira geração (Método de Sanger) com 96 capilares, ABI 3730 xl “DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, CA)”, no qual as corridas foram efetuadas em capilares de 50 cm utilizando o polímero POP7, o “BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit” e controle interno com DNA de pGEM™-3Zf(+) fornecidos pela “Applied Biosystems”.

### **3.6. Análise da sequência obtida**

A sequência obtida do gene *ps4* foi editada a partir do programa Bioedit e por meio da ferramenta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”), utilizando o

algoritmo *blastn* e *blastp*, foram feitas comparações entre a sequência obtida e aquelas depositadas no Genbank referente às parasporinas (Kuroda et al., 2013). Seguidamente, o alinhamento de genes e proteínas de parasporinas 4 foi realizado utilizando a ferramenta Clustal Omega (Kuroda et al., 2013). Os arquivos dos alinhamentos obtidos no Clustal Omega foram transferidos para o programa Geneious.

Posteriormente foi utilizado o software IQ-tree 2 para a criação de uma árvore filogenética não enraizada a partir de todas as sequências de parasporinas do banco de dados e a sequência da possível nova subclasse de PS4 encontrada no trabalho. Sua edição e visualização foi feita pela ferramenta iTOL. A árvore foi construída pelo método de Máxima Verossimilhança com bootstrap de 1000 repetições (Wiley e Lieberman, 2011).

A predição da estrutura tridimensional da sequência de aminoácidos da proteína hipotética (ANN35810.1) foi realizada pelo programa AlphaFold2. O AlphaFold2 gera um arquivo PDB, que pode ser analisado com sistemas padrão de visualização molecular, como PyMol (Veit et al., 2022). Dessa forma, sua visualização em “cartoon” e comparação entre a proteína modelada no AlphaFold e a PS4 do banco de dados foi realizada pelo software PyMol. Além disso, para a análise dos domínios de ambas as proteínas PS4 foi utilizado a plataforma Interpro (Aktar et al., 2019).

### **3.7. Solubilização e ativação da proteína a partir dos cristais**

Para a solubilização e ativação da proteína a partir dos cristais foi realizada a extração de proteína total da linhagem *B.t. coreanensis*. Essa extração se deu pela retirada de 1 µl da suspensão de esporos em água deionizada do estoque de bactérias do presente laboratório. Essa alíquota foi semeada em uma placa de Petri contendo meio de cultura “Nutriente Agar” (NA) (Gordon et al., 1973) e incubada em estufa a 30°C por 16h.

Após uma colônia foi retirada da placa e foi colocada em tubo Falcon® (50 mL) esterilizado contendo 10 mL de meio NYSM (Yousten, 1984; Martins et al., 2006) para a realização do pré-inoculo. Esse tubo foi submetido a uma agitação de 200 rpm, por 12h ou “overnight”, a uma temperatura de 28°C.

Posteriormente o pré inoculo foi transferido para um erlenmeyer de 1L contendo um volume de 200 mL de meio NYSM. O inóculo foi incubado em um “shaker” a 200 rpm por 72 horas a 28°C. Passado o período de cultivo, foi realizado a centrifugação da cultura bacteriana a 10.000 rpm por 20 minutos a 10°C. O pellet obtido foi lavado 2 vezes com água estéril gelada e a cada lavagem foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C (Santos, 2018).

Após o processo de lavagem o pellet foi dissolvido em um 1mL de tampão de solubilização (50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH.10; 1mM EDTA; 10mM DTT) e foi incubado por 1h a 37°C. Passado o período de incubação, a centrifugação da amostra foi realizada por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um microtubo e ajustado o pH para 8 (Santos, 2018).

A proteína solubilizada foi filtrada com uma membrana de 0.45µm e posteriormente foi quantificada pelo método de Bradford, utilizando a proteína albumina do soro bovino (BSA) na curva padrão (Bradford, 1978; Ishii e Ohba, 1993; Lenina et al., 2014).

A PS4 possui uma proteína inativa de 31 a 34 kDa e quando ativada pela proteinase K produz uma proteína ativa de 25 a 28 kDa (Suárez-Barrera, 2021; Santos et al., 2022; Rezaei et al., 2023). Por conseguinte, para a análise do perfil proteico da linhagem, parte da amostra foi utilizada para ativação e o restante foi congelado a -20°C para aplicação em gel de poliacrilamida.

Considerando a quantificação obtida no Bradford, a ativação foi realizada adicionando-se 30 µg de Proteinase K para 1mg/mL de proteína com incubação por 1h sob baixa agitação a 37°C. A ativação foi interrompida com a adição de PMSF em uma concentração final de 1mM (Rodrigues, 2012).

As amostras, tanto a pró-toxina (sem tratamento com proteases) quanto a toxina (proteínas ativadas com proteinase K), foram analisadas por meio de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 12%) (Laemmli e Favre, 1973). Para isso, foi pipetado 10 µL de amostra e 10 µL corante Azul de Comassie (40% metanol, 10% ácido acético e 0,1% de Azul de Comassie) em cada tubo e foi aquecido a 100° C por 5 minutos. Posteriormente foi aplicado 17 µL de cada amostra no gel.

### **3.8. Cultivo bacteriano e preparo da cultura de esporos**

Para o cultivo bacteriano foram utilizadas as linhagens: *B.t. coreanensis*, portadora da possível nova subclasse de PS4; *B.t. shandongiensis*, portadora da única subclasse de PS4 presente no banco de dados e descrita como citotóxica às células cancerígenas e *B.t. kurstaki* (HD-73), linhagem conhecida pela sua alta capacidade inseticida. Estas linhagens estavam mantidas a temperatura ambiente na forma de papel filtro impregnada com uma suspensão de esporos em água deionizada estéril. Uma alíquota de 1 µl foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura “Nutriente Agar” (NA) (Gordon et al., 1973). O inóculo foi semeado com o auxílio de uma alça de Drigalsky esterilizada e as placas foram incubadas em estufa a 30°C por 16h.

Posteriormente, pré-culturas foram feitas inoculando colônias isoladas em tubo Falcon® (50 mL) esterilizado contendo 10 mL de meio NYSM (Yousten, 1984, Martins et al., 2006), com auxílio de uma pinça e palitos estéreis. Os tubos foram submetidos a uma agitação de 200 rpm, por 12h ou “overnight”, a uma temperatura de 28°C.

Em seguida, o volume total de 10 mL de cada cultura bacteriana foi transferido para erlenmeyers de 1L contendo um volume de 200 mL de meio NYSM. Os inóculos foram incubados em um shaker a 200 rpm por 72 horas a 28°C. Após o cultivo, as culturas bacterianas foram transferidas para tubos Falcon® de 50 mL e foram centrifugados a 5000 xg por 10 minutos. Este procedimento foi repetido até que o volume total de células fosse precipitado, sempre descartando o sobrenadante.

O sedimento obtido foi liofilizado em Liofilizador LJJ02 (JJ Científica) até a obtenção de um pó fino. Posteriormente esse pó foi pesado e diluído para a realização de bioensaios de toxicidade em insetos e para a caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura.

### **3.9. Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura**

O produto obtido da liofilização da cultura de esporos das linhagens *B.t.*

*coreanensis*, *B.t. shandongiensis* e *B.t. kurstaki* (HD-73) foram caracterizadas quanto a morfologia de suas inclusões cristalinas. Para isso, o pó da liofilização foi colocado em suportes metálicos preparados com fita de carbono. Em seguida o material foi metalizado com ouro pelo período de 90 segundos, utilizando um metalizador EMITECH modelo K550. As inclusões cristalinas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO MA10 (Sabiá Júnior, 2015).

### 3.10. Bioensaios

A atividade tóxica das linhagens de *B.t. coreanensis*, *B.t. shandongiensis* e *B.t. kurstaki* HD-73 foram determinadas por meio de ensaios em dieta artificial com neonatas de *Spodoptera frugiperda*. Um ensaio de dose única de 2000 ng/cm<sup>2</sup> foi realizado para comprovação de toxicidade das linhagens (Praça et al., 2003). Para o ensaio foram feitas 6 repetições com 16 larvas para cada linhagem.

O sedimento das linhagens testadas obtido na liofilização foi ressuspendido em água para obtenção de uma concentração final de 2000 ng/cm<sup>2</sup>. Uma diluição seriada foi preparada na qual: suspensão I = 1 mg/ml; suspensão II = 571,4 µL da suspensão I acrescido de 428,6 µL de água e; suspensão III = 200 µL da suspensão II em 800 µL de água (Praça et al., 2003).

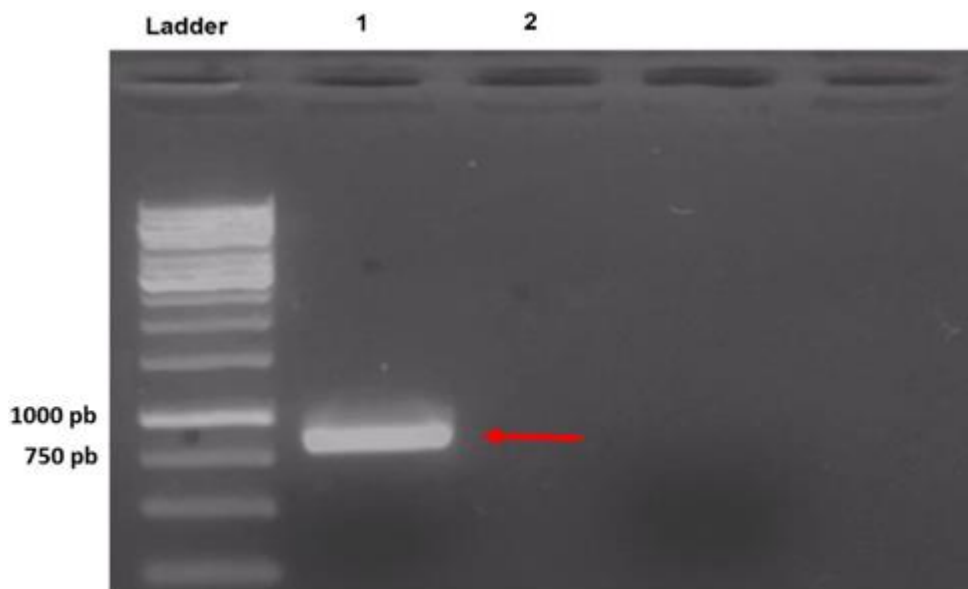
A dieta artificial foi preparada e distribuída em placas de poliestireno de 128 poços (BioServ, Frenchtown, NJ). Em cada poço, um volume de 35 µl da suspensão III foi pipetado na superfície da dieta artificial. Após a completa absorção da suspensão contendo esporos e cristais das linhagens de Bt, as neonatas de *S. frugiperda* foram individualmente distribuídas e seladas. As placas foram mantidas em salas climatizadas segundo Jackson et al. (2007) e Santos Júnior et al. (2009).

A avaliação da mortalidade foi realizada após sete dias. Uma testemunha sob as mesmas condições de experimento foi utilizada nos bioensaios, onde o volume de suspensão de esporos/cristais incorporado à dieta artificial foi substituído por água estéril. Após os sete dias a quantidade de neonatas mortas foi contabilizada. A efetividade das linhagens foi considerada quando obtida mortalidade maior que 50% (Praça et al., 2003).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo bacteriano da linhagem *Bacillus thuringiensis coreanensis*, utilizada no presente trabalho, permitiu a extração do DNA genômico com alta qualidade e concentração esperadas e livre de impurezas, podendo desta forma, ser utilizado no isolamento do gene.

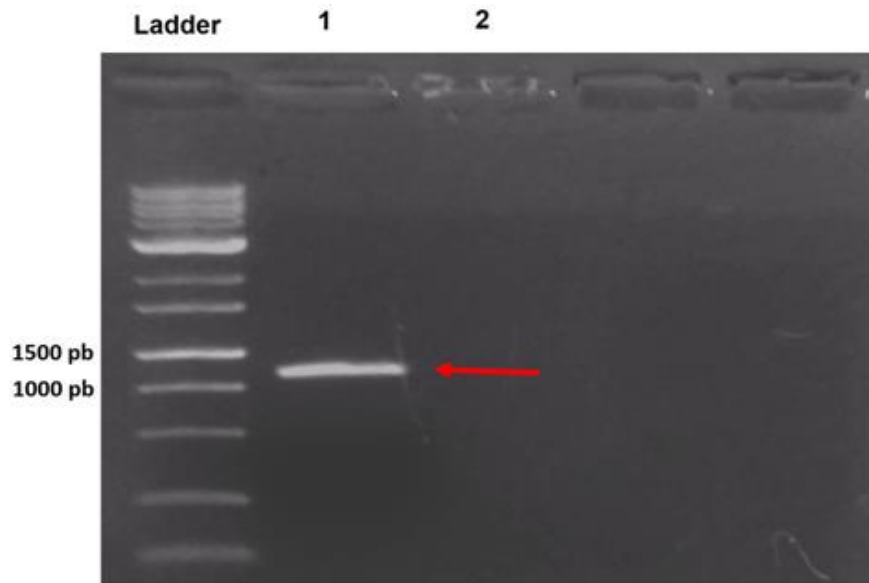
Para o isolamento do gene *ps4* da proteína hipotética (CP016197.1:47747-48574), notou-se que o início da sequência apresentava regiões não conservadas, dificultando o desenho dos iniciadores a serem utilizados nas reações de PCR. Como solução a isso, o iniciador direto foi sintetizado considerando 10 bases antes do início do gene de interesse, utilizando o genoma completo do plasmídeo ST7 da linhagem *B.t. coreanensis* sequenciado e presente no Genbank (CP016197.1). Assim, foi possível a amplificação do gene completo com o tamanho esperado de 838 pb, visto que o gene no banco de dados apresenta 828 pb e houve o acréscimo das 10 bases na elaboração do iniciador direto (Figura 6).



**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose a 1% evidenciando o produto da amplificação do gene *ps4* a partir do DNA genômico da linhagem *Bacillus thuringiensis coreanensis*; Ladder: Marcador molecular de 1 kb (Fermentas); 1: Gene *ps4* com o tamanho de 838 pb (indicado pela seta vermelha); 2: Controle negativo da reação de

PCR contendo água Mili Q estéril no lugar do DNA.

O produto obtido da PCR foi devidamente purificado e clonado no vetor "pGEM T-Easy", sendo sua clonagem confirmada no gel de eletroforese. A clonagem foi obtida na fase correta de leitura junto ao promotor presente no vetor e apresentou o valor esperado de 1018 pb considerando a sequência do gene e a sequência referente ao vetor. (Figura 7).

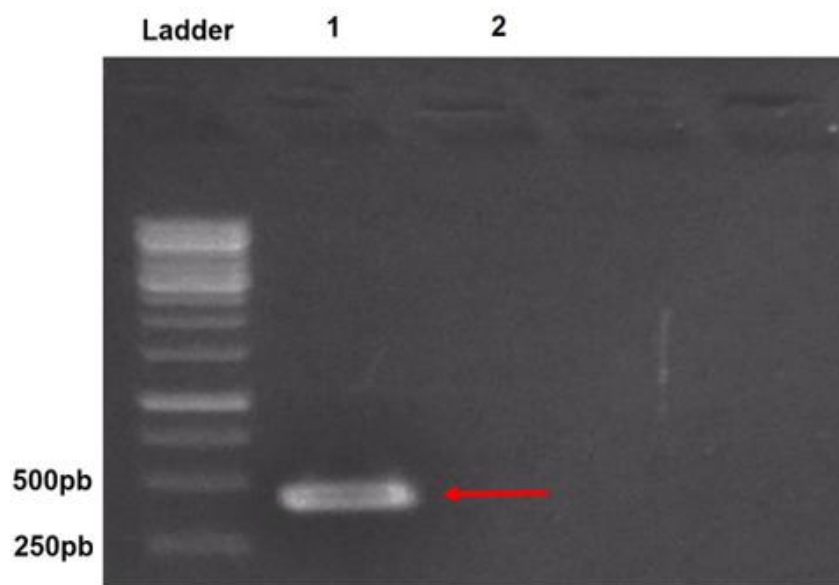


**Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose a 1% evidenciando o produto da amplificação do gene *ps4* de *Bacillus thuringiensis coreanensis*, a partir do DNA plasmidial de um clone positivo de *Escherichia coli* DH10B.; Ladder: Marcador molecular de 1 kb (Fermentas); 1: Clone do Gene *ps4* com o tamanho de 1018 pb (indicado pela seta vermelha) 2: Controle negativo da reação de PCR contendo água Mili Q estéril no lugar do DNA.

A amostra foi devidamente purificada e enviada para sequenciamento, na qual o fragmento, utilizando a ferramenta *blastn*, apresentou 100% de similaridade com a sequência da proteína hipotética (CP016197.1:47747-48574) do banco de dados. Entretanto, mesmo tendo o gene inteiro amplificado, não foi possível seu total sequenciamento. Como o inserto apresentava 838 pb e havia mais à região relativa ao vetor foi necessário o desenho de mais um iniciador (PS4M - 5'TTGGACAGATTCGCTTCAAGT3') para a obtenção da sequência do gene

completo, visto que o sequenciador Sanger sequencia até 800 pb. O iniciador sintético também foi obtido pela sequência do gene da proteína hipotética (CP016197.1:47747-48574).

A amplificação gerou uma banda de 380 pb no gel de eletroforese, sendo 280 pb do gene e 100 pb referente ao iniciador SP6 do vetor (Figura 8). A sequência obtida desse fragmento mostrou 100% de similaridade com a região faltante do gene da proteína hipotética (possível nova subclasse da parasporina 4) e dessa forma foi possível obter a sequência total do gene.



**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose a 1% evidenciando o produto de amplificação da porção final do gene *ps4* da linhagem *Bacillus thuringiensis coreanensis*, a partir do DNA plasmidial do clone positivo de *E.coli* DH10B. Ladder: Marcador molecular de 1 kb (Fermentas); 1: Fragmento referente à porção final do gene *ps4* com o tamanho de 380 pb (indicado pela seta vermelha) 2: Controle negativo da reação de PCR contendo água Mili Q estéril no lugar do DNA.

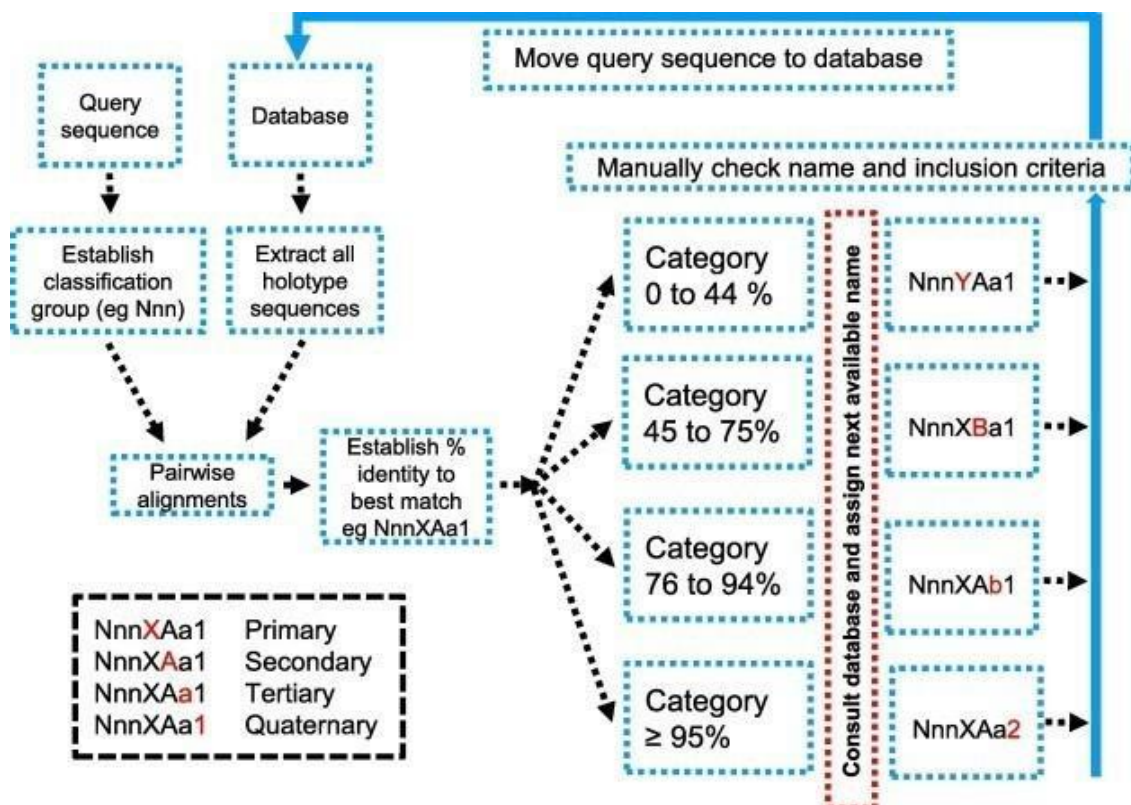
A análise da sequência total do gene *ps4* do presente trabalho, por meio da ferramenta *blastn*, mostrou 100% de similaridade com a sequência do gene da proteína hipotética (CP016197.1:47747-48574) e 92,03% com a sequência da subclasse de PS4 descrita no banco de dados (AB180980). Esses resultados puderam ser visualizados através dos alinhamentos dos genes pela ferramenta “Geneious” (Figura 9).



**Figura 10:** Alinhamento da sequência da proteína hipotética (ANN35810.1) que apresenta 100% de similaridade com a encontrada no trabalho, com a proteína PS4Aa1 (BAD22577.1), utilizando a ferramenta “Clustal Omega”. Ambas apresentam 90,55% de similaridade de acordo com a ferramenta *blastp*.

Tendo como base a porcentagem de dissimilaridade entre a proteína hipotética (CP016197.1:47747-48574) e a parasporina 4 do banco de dados (AB180980), pode-se considerar que a sequência clonada se trata de uma nova subclasse de parasporina 4, nomeada neste trabalho como *ps4Ab1*.

A nomeação da proteína se deu a partir dos parâmetros definidos para nomenclatura de proteínas pesticidas de *Bacillus thuringiensis* (Crickmore et al., 2021), visto que não há nomenclatura específica e atualizada para as proteínas parasporinas. Desse modo, a nova subclasse de parasporina sugerida apresentou similaridade entre 76% e 96% em relação às sequências depositadas no banco de dados levando a alteração no terceiro nível de classificação (b) (Figura 11).

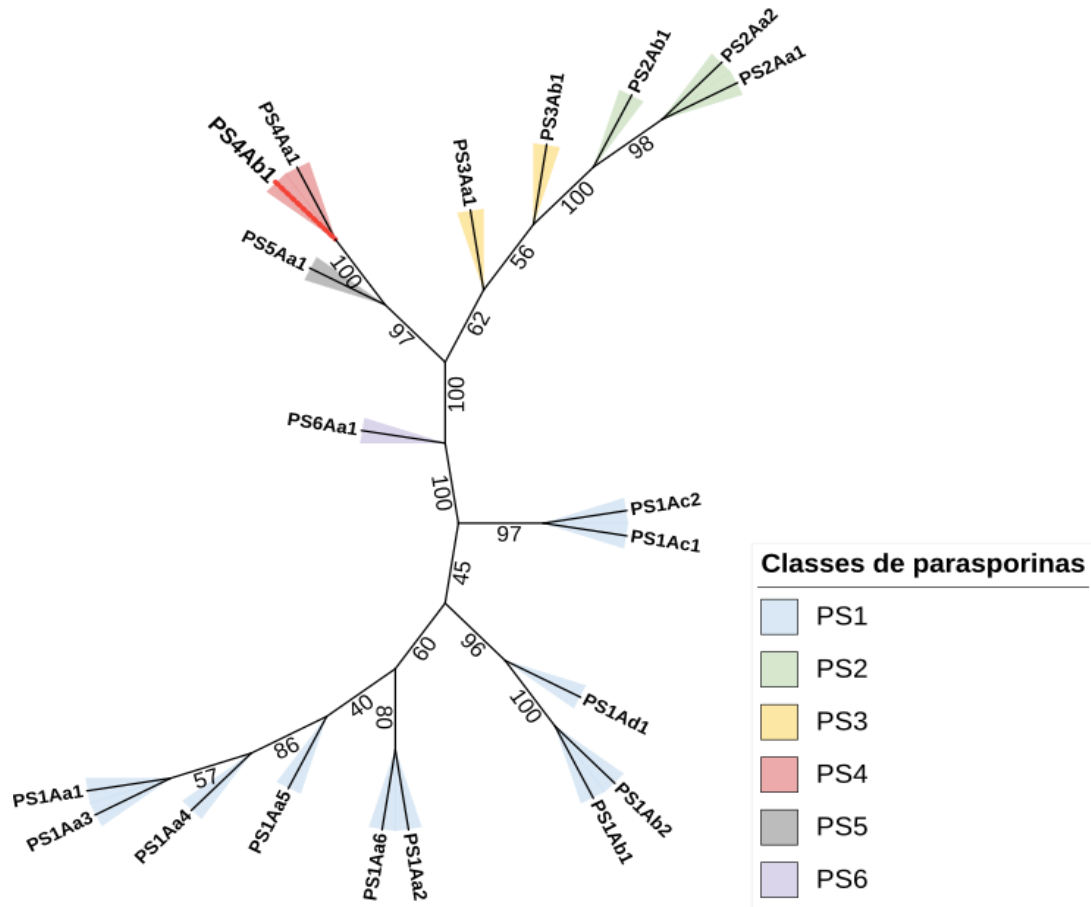


**Figura 11:** Processo utilizado pelo comitê de nomenclatura para nomear novas

proteínas pesticidas bacterianas. Adaptado de Crickmore, Neil et al. (2021). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of invertebrate pathology**, v. 186, p. 107438. Copyrights © (2020) autores e publicado pela Elsevier Inc.

A similaridade entre as sequências também foi confirmada conforme observado na árvore filogenética não enraizada (Figura 12). A árvore foi construída pelo método de Máxima Verossimilhança, que busca com o alinhamento das sequências fornecido e com base no modelo evolutivo a árvore mais verossímil dentre as árvores possíveis (Kapli & Telford, 2020).

A árvore construída apresentou um alto suporte estatístico de “bootstrap” ao longo de quase todos seus nós internos, demonstrando a proximidade entre as classes de parasporina (PS), confirmando a proximidade entre a *ps4Aa1* e *ps4Ab1*, visto que compartilham o mesmo nó, sendo considerados grupos irmãos, com um alto valor de suporte de clado (100) (Wiley & Lieberman, 2011).



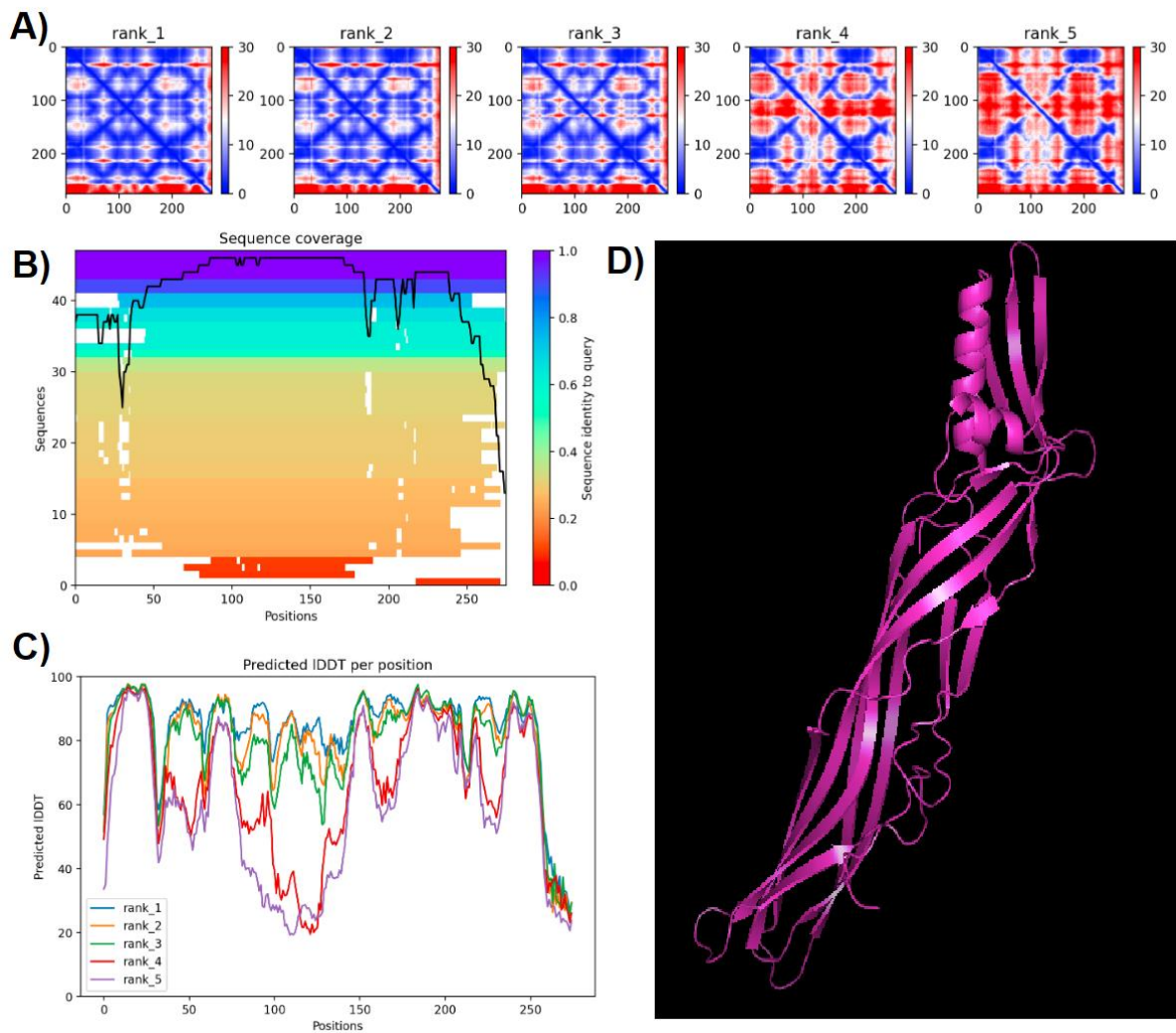
**Figura 12:** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com os valores de “bootstrap” para as classes e subclasses de parasporinas, com a inclusão da proteína encontrada no trabalho (PS4Ab1) construída pela ferramenta “IQTree” e editadas na plataforma iTOL. A árvore mostra que a proteína pleiteada como uma nova subclasse de PS4 (ramo vermelho) está presente como grupo irmão da Parasporina 4 do banco de dados (PS4Aa1), e esse clado em que ambas pertencem forma um grupo com alto suporte (“bootstrap”=100).

O alinhamento realizado no “Clustal Omega” para demonstrar a similaridade entre as sequências de parasporina para a construção da árvore usou um método de estimativa aproximada de quão semelhante é cada par de sequências, alinhando primeiramente o par de sequências mais semelhantes e adicionando progressivamente sequências mais distantemente relacionadas, de acordo com a árvore guia (Kapli & Telford, 2020). Logo, pode-se observar na árvore que, além da similaridade com a sequência *ps4Aa1*, a sequência encontrada também é próxima das parasporinas 2, 3 e 5.

Essa proximidade entre a classe de parasporina 2 e 4 vai além da árvore gerada no trabalho, visto que ambas atuam em linhagens de células do câncer semelhantes e possuem proximidade também pelas aerolisinas que formam poros do tipo  $\beta$ , que se ligam inespecificamente à membrana plasmática das células, formando oligômeros que levam à morte da célula-alvo (Akiba *et al.*, 2009; Ohba *et al.*, 2009).

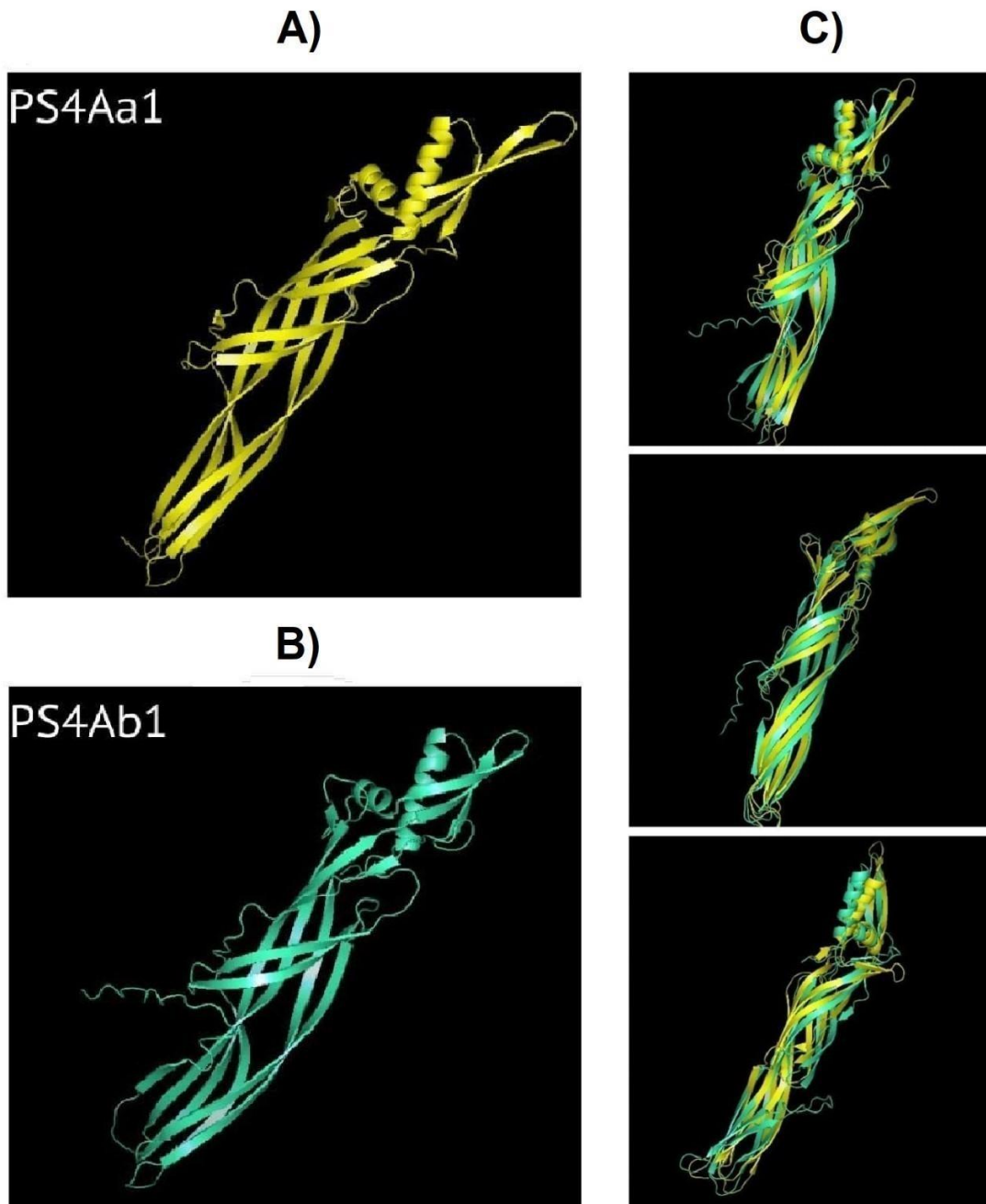
É descrito na literatura que linhagens de Bt que apresentam proteínas Cry não inseticidas são mais abundantes na natureza do que proteínas Cry inseticidas (Santos *et al.*, 2022, Akiba & Okumura, 2017; Ohba e Aizawa 1986). E foi essa informação há anos atrás que levou à descoberta das parasporinas. Proteínas Cry não inseticidas, não hemolíticas, com citotoxicidade contra células cancerígenas. (Mizuki *et al.*, em 2000). À vista disso, a descoberta de novas subclasses e até de novas classes se mostra uma realidade próxima e promissora.

Com a realização da modelagem da proteína PS4Ab1 pelo programa "AlphaFold2", foi possível obter cinco modelos e dois conjuntos de dados importantes para avaliar a qualidade dos modelos previstos. Um deles foi o "Teste de diferença de distância local prevista" (pLDDT) e a outra a pontuação de "erro alinhado de previsão" (PAE) (Veit; Gadalla; Zhang, 2022), com ambas as análises foi possível identificar o modelo 5 como o de maior confiabilidade (Figura 13).



**Figura 13:** Métricas de confiança para a estrutura prevista da PS4Ab1. A) Erro alinhado previsto (PAE) para todos os 5 modelos. B) Cobertura da PS4Ab1 (BAD22577.1) no MSA gerado por “colabfold\_search” com mmseqs2. C) pLDDT para todos os 5 modelos. D) A previsão da estrutura de maior confiança (Rank 5) da proteína PS4b1 modelada no AlphaFold2 e visualizada no PyMOL no modelo “Cartoon”.

A comparação entre as estruturas das proteínas PS4Aa1 (BAD22577.1) e PS4Ab1 realizado pelo programa PyMOL, reafirmou a similaridade entre ambas também em nível estrutural (Figura 14). Quando ambas as proteínas foram analisadas no InterPro, apresentaram os mesmos domínios e estrutura, não apresentando blocos conservados ou estrutura típica das proteínas inseticidas Cry-3d (Okumura et al., 2006).



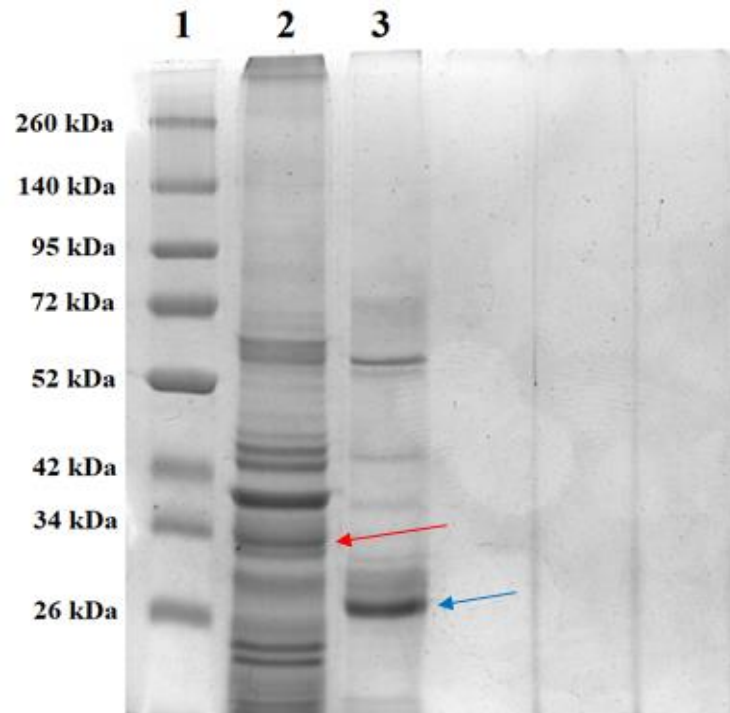
**Figura 14:** Modelagens visualizadas na ferramenta PyMOL no modelo “Cartoon”. A) Estrutura da proteína PS4Aa1 (2D42) exportada do banco de dados PDB (“Protein Data Bank”) e visualizada no PyMOL. B) Estrutura da proteína PS4Ab1 modelada no

AlphaFold2 e visualizada no PyMOL. C) Estrutura das proteínas PS4Aa1 (BAD22577.1) e PS4Ab1 alinhadas no programa PyMOL para a visualização das similaridades entre suas estruturas.

As duas possuem a presença da toxina tipo Aerolisina e da toxina Clostridium epsilon ETX. E segundo a literatura, já é de conhecimento que a proteína PS4Aa1 (BAD22577.1) apresenta similaridade de sequência com a toxina Epsilon (ETX) (21%) e com a toxina Aerolisina (10%) (Velasquez; Rojas; Cerón, 2018). São essas toxinas as responsáveis por se ligarem às células eucarióticas e se agregarem para formar poros nas bicamadas lipídicas, levando à destruição da permeabilidade da membrana e à lise osmótica (Aktar et al., 2019).

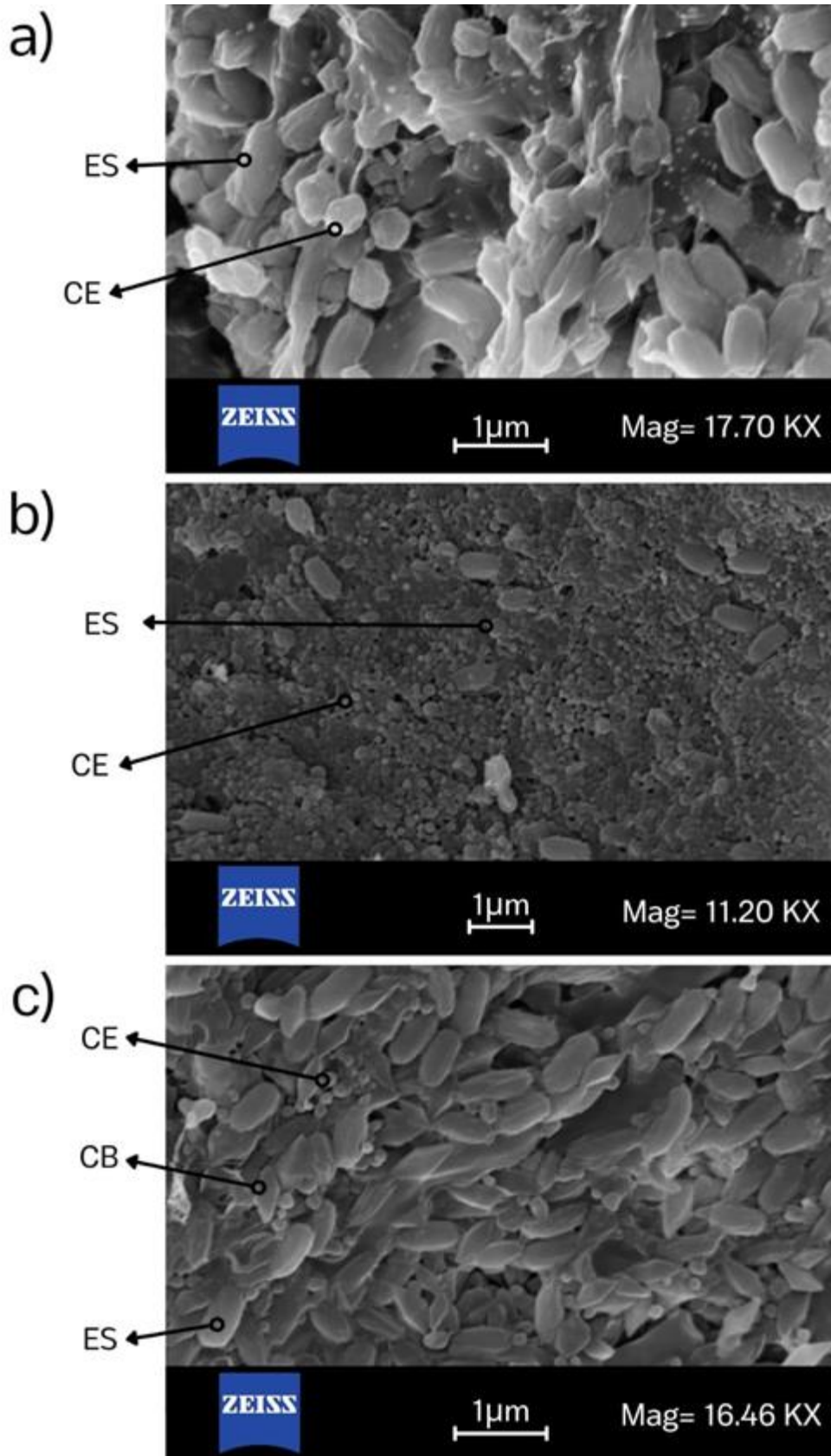
Por consequência, pode se inferir que ambas as proteínas podem possuir funcionalidades iguais ou semelhantes, podendo se ligar de forma inespecífica à membrana plasmática e formarem poros nas células-alvo (Velasquez; Rojas; Cerón, 2018). Porém somente após os ensaios de citotoxicidade dessa nova proteína encontrada é que será possível afirmar sua real ação.

Com a solubilização e ativação da proteína PS4Ab1 a partir dos cristais proteicos de *B.t. coreanensis* e a análise do perfil proteico em gel SDS-PAGE, foi possível identificar uma banda próxima aos 34kDa que pode estar associada a parasporina 4 inativa. Também foi verificada uma banda de 27 kDa referente a parasporina 4 ativa (Figura 15). Tamanhos similares de ambos foram relatados na literatura (Suárez-Barrera, 2021; Santos et al., 2022; Rezaei; Moazamian, Montazeri-Najafabady; 2023), o que mostra mais uma vez a similaridade entre a proteína encontrada e a PS4Aa1 (BAD22577.1).



**Figura 15:** Perfil eletroforético em gel de SDS-PAGE 12% da proteína total solubilizada da linhagem de *Bacillus thuringiensis coreanensis* antes e após ativação com Proteinase K. 1. Marcador “Spectra TM Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 2. Proteína total solubilizada não ativada evidenciando a banda referente à protoxina PS4Ab1 (indicada pela seta vermelha); 3. Proteína total solubilizada e ativada com Proteinase K evidenciando a banda referente à proteína PS4Ab1 ativada (indicada pela seta azul).

Durante a caracterização morfológica por Microscopia de Varredura, que foi realizado para correlacionar os tipos de cristais presentes com a presença de parasporina na linhagem, foi possível a obtenção de imagens dos cristais das três linhagens analisadas (Figura 16), sendo que na linhagem *B.t. kurstaki* foi possível observar a presença de cristais bipiramidais e esféricos, já nas linhagens *B.t. shandongensis* e *B.t. coreanensis*, foram encontrados somente cristais esféricos.



**Figura 16:** Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporo/cristal das linhagens:

A) *Bacillus thuringiensis coreanensis*, mostrando a predominância de cristais esféricos; B) *Bacillus thuringiensis shandongiensis*, mostrando a predominância de cristais esféricos; C) *Bacillus thuringiensis kurstaki*, mostrando a presença de cristais esféricos e bipiramidais. (ES – Esporos; CE – Cristais esféricos; CB – Cristais bipiramidais.)

Este fato também foi relatado por Sabiá Júnior (2015) que, em sua pesquisa verificou que a caracterização morfológica dos cristais das linhagens analisadas apresentou, em sua maioria cristais esféricos, sendo essa a única diferença entre a linhagem que apresentava parasporina com as outras de *Bacillus*. Segundo o autor, as formas assumidas pelos cristais podem conter informações sobre sua toxicidade, porém pouco se sabe sobre a relação entre a morfologia dos cristais e a possível associação com proteínas parasporinas.

Lenina et al. (2014) e Aboul-Soud et al. (2019), descreveram que proteínas parasporinas também exibem diversidade quanto à morfologia do cristal, podendo variar entre esférica, bipiramidal a irregular. Para estes autores essa variação pode indicar a diversidade de proteínas cristalinas em isolados. Já nos estudos realizados por Uemori et al. (2007), Poornima et al. (2010) e Moazamian et al. (2018), as inclusões parasporais esféricas eram as estruturas morfológicas comuns associadas às linhagens de *Bt* produtoras de parasporinas, corroborando os dados encontrados neste trabalho.

Como esperado, os bioensaios de toxicidade mostraram a efetividade da linhagem padrão *B.t. kurstaki* no controle de *S. frugiperda*, com taxa de mortalidade de 86,4% das neonatas testadas. Já *B.t. shandongiensis* e *B.t. coreanensis* apresentaram baixa letalidade, com mortalidade de 25% e 13,5%, respectivamente. O controle feito com água apresentou mortalidade de 7,2%.

Os resultados encontrados na realização dos bioensaios mostraram que as linhagens *B.t. shandongiensis* e *B.t. coreanensis* não apresentam atividade inseticida em *S. frugiperda*, também conhecida como lagarta do cartucho (Lepidoptera: Noctuidae). Essa praga é extremamente destrutiva e considerada espécie-praga primária à cultura do milho no Brasil, causando grandes perdas econômicas (Bakry & Abdel-Baky, 2023; Marega & Marques, 2021; Silva Brandão et al., 2018). Sendo

assim, a atividade não inseticida da proteína PS4Ab1, encontrada no presente trabalho, foi parcialmente reafirmada.

Pode-se dizer parcialmente, pois a presença das parasporinas ocorre não somente em linhagens não inseticidas. O estudo de como se dá a diferença entre uma linhagem Bt que apresenta atividade antitumoral daquela não apresenta, ainda requer discussões. Sabiá Júnior (2015) concluiu em seu trabalho que apesar de várias de suas linhagens apresentarem os genes para parasporinas, nem todas apresentaram toxicidade contra células cancerígenas. Apenas a linhagem que não apresentava atividade inseticida exerceu atividade anti-tumoral.

Percebe-se que, apesar da evolução do conhecimento acerca da toxicidade das proteínas parasporinas, pouco se sabe realmente sobre seu caráter inseticida e citotóxico. Alguns trabalhos sugerem que algumas parasporinas podem apresentar ambas as atividades (Soberón *et al.*, 2018, Mendoza-Almanza *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022).

Anteriormente as parasporinas eram relatadas como toxinas Cry não inseticidas e não hemolíticas com atividade citotóxica seletiva contra células cancerígenas. Entretanto, atualmente linhagens que apresentam atividade inseticida, mas não hemolíticas, são aceitas como parasporinas. Portanto, algumas parasporinas podem matar inseto-pragas e também células cancerígenas (Mendoza-Almanza *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022).

O mesmo pode ser tido para o parâmetro hemolítico, apesar de uma característica importante, linhagens com baixa atividade hemolítica também podem apresentar atividade anticancerígena (Aberkane *et al.*, 2020; Ichikawa *et al.*, 2008; Nadarajah *et al.*, 2008).

Essa foi a justificativa para se realizar o teste de toxicidade da linhagem *B.t. coreanensis* em insetos praga. Se tratando de uma nova subclasse, a ação sobre insetos e células cancerígenas ainda é desconhecida. Dessa forma, mesmo com a ausência de atividade inseticida contra a *Spodoptera frugiperda*, o bioensaio com outras espécies e gêneros de Lepidoptera e até mesmo com outros ordens de insetos, se mostram importantes, visto que sua atividade pode se mostrar diferente em outros

insetos e como citado acima, uma mesma linhagem pode apresentar tanto atividade inseticida quanto citotóxica (Mendoza-Almanza *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022).

Partindo desse pressuposto, em um trabalho realizado por Lee *et al.* (2004) a linhagem *B.t. coreanensis* também não apresentou efeito inseticida contra larva de *Bombyx mori* (Lepidoptera), porém, se apresentou moderadamente tóxica para larvas de *Culex pipiens* (Diptera). O que reafirma a necessidade da realização de diferentes bioensaios com ordens diferentes.

Descrita anteriormente, a linhagem *B.t. coreanensis* já se mostrou efetiva contra algumas linhagens de câncer, sendo que suas proteínas cristalinas parasporais são ditas como não inseticidas e não hemolíticas por Namba *et al.* (2003). Porém, não houve nenhum estudo *in silico* sobre a proteína hipotética presente nessa linhagem que apresenta grande similaridade com a PS4 do banco de dados.

Sobre o genoma da linhagem *B.t. coreanensis*, Zhang *et al.* (2020), relatou a presença do plasmídeo ST7 como portador de cinco genes para proteínas cristalinas inseticidas, sendo os tipos Cry22, Cry32, Cry45, Cry62 e Cry73. A proteína PS4Aa1, anteriormente denominada Cry45Aa1, possui homologia com a Cry45 contida no plasmídeo ST7, dessa forma ele afirma que ambas podem possuir toxicidade para os mesmos tipos de células de câncer. Assim, a parasporina encontrada neste trabalho pode apresentar o mesmo resultado, visto que está presente no mesmo plasmídeo.

Um outro fator interessante é que as parasporinas podem ser divididas em dois grupos, as de maior massa molecular (PS1, PS3 e PS6), que apresentam aproximadamente 80 kDa, e quando ativadas 60 kDa, e as de menor massa molecular (PS2, PS4 e PS5), com aproximadamente 33 a 37kDa e ativadas 30kDa (Súares-Barrera *et al.*, 2021).

Proteínas parasporinas de maior peso molecular estão mais relacionadas às proteínas Cry inseticidas e, por isso, além da sua atividade antitumoral, trabalhos sobre seu papel como biocontrolador de inseto-pragas e vetores de doenças têm sido mais difundidos, enquanto as de menor peso molecular apresentam grande importância na medicina e na biotecnologia (Súares-Barrera *et al.*, 2021). Essa informação corrobora a ausência de atividade inseticida em *S. frugiperda* da nova

subclasse de PS4 encontrada neste trabalho e reforça a necessidade de testes sobre sua citotoxicidade para sua aplicação na medicina humana e animal.

## 5. CONCLUSÕES

Uma nova subclasse de proteína parasporina 4 (PS4) foi identificada no presente trabalho. Esta parasporina foi nomeada como PS4Ab1 e será catalogada no banco de dados de Parasporinas (“Committee of Parasporin Classification and Nomenclature” - CPCN).

A análise *in silico* da parasporina PS4Ab1 sugeriu um modelo para esta proteína evidenciando domínios importantes para a citotoxicidade de células eucarióticas tumorais.

A PS4Ab1 não apresentou atividade bioinseticida à *Spodoptera frugiperda*, demonstrando uma das características mais comuns entre as parasporinas registradas nos bancos de dados.

Embora linhagens e isolados de *Bacillus thuringiensis* sigam sendo de grande interesse científico, as parasporinas continuam pouco exploradas pelos pesquisadores. Isto posto, o presente trabalho procurou contribuir para com o conhecimento dessas importantes proteínas, dando abertura para o avanço dos estudos acerca das mesmas.

## 6. REFERÊNCIAS

Aberkane, Lila et al. (2020) In vitro cytotoxicity of parasporins from Native Algerian *Bacillus thuringiensis* strains against laryngeal and alveolar cancers. **Current microbiology**, v. 77, p. 405-414.

Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, van der Voort M (2011) Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. **Food microbiology** 28:199-208.

Aboul-Soud, Mourad AM et al. (2019) Specific cytotoxic effects of parasporal crystal proteins isolated from native Saudi Arabian *Bacillus thuringiensis* strains against cervical cancer cells. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 506.

Agaisse H, Lereclus D (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of bacteriology** 177:6027-32.

Akiba, Toshihiko et al. (2009) Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. **Journal of molecular biology**, v. 386, n. 1, p. 121-133.

Akiba, Toshihiko; Okumura, Shiro. (2017). Parasporins 1 and 2: their structure and activity. **Journal of invertebrate pathology**, v. 142, p. 44-49.

Aktar, Nasima et al. (2019) *In silico* Studies of Parasporin Proteins: Structural and Functional Insights and Proposed Cancer Cell Killing Mechanism for Parasporin 5 and 6. **Microbial Bioactives**, v. 2, n. 1, p. 82-90.

Assaeedi, A. S.; Osman, G. H. (2017) Isolation, cloning, DNA sequencing and bioinformatics analysis of the parasporin–1 gene of *Bacillus thuringiensis*. **J. Proteo. Bioinform**, v. 10, p. 144-151.

Bakry, M. M. S.; Abdel-Baky, Nagdy F. (2023) Impacto da infestação da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) nas características de crescimento do milho e na perda de rendimento. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e274602.

Barssoum R et al. (2023) Biochemical limitations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides production in a wheat bran culture medium. **Research in microbiology** 174:104043.

Brasil. Portal da Saúde SUS. **Tratamento do câncer**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento>. Acesso em 17 de dez. 2023.

Bravo, A. et al. (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972.

Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49:423-435.

Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect biochemistry and molecular biology** 41:423-431.

Chubicka, Thomas et al. (2018) A parasporin from *Bacillus thuringiensis* native to Peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway. **Journal of biosciences**, v. 43, n. 2, p. 407-416.

Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews** 62:807-813.

Crickmore, Neil et al. (2021) A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of invertebrate pathology**, v. 186, p. 107438.

CTNBIO. Tabela de Plantas - Uso Comercial. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/>. Acesso em: 30 nov. 2023.

de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual review of genetics** 37:409-433.

de Oliveira Santos M, de Lima FCDS, Martins L FL, Oliveira JFP, de Almeida LM, de Camargo Cancela M (2023) Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia** 69:e-213700.

dos Santos, Thais N. F. et.al. (2022) Detecção, clonagem e análise in silico do gene parasporina 4 em linhagens de *Bacillus thuringiensis*. **Ciência da Saúde: Desafios e potencialidades em pesquisa**. Editora científica digital, v.1, n. 1, p. 136-153.

Du C, Nickerson KW (1996) *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Applied and environmental microbiology** 62:3722-3726.

- Ekino K et al. (2014) Cloning and characterization of a unique cytotoxic protein parasporin-5 produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 strain. **Toxins** 6:1882-1895.
- Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 93:5389-5394.
- Federici, BA, Park H-W, Sakano Y (2006) Insecticidal protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. In: **Inclusions in prokaryotes**. Springer Berlin Heidelberg, p. 195-236.
- Gill SS, Hornung JM (1987) Cytolytic activity of *Bacillus thuringiensis* proteins to insect and mammalian cell lines. **Journal of Invertebrate Pathology** 50:16-25.
- Girija D, Deepa K, Chubicka T, Shidhi PR, Hussan S, Raghavamenon AC, Babu TD (2023) Structural and functional validation of a cloned parasporin from *Bacillus thuringiensis* isolate KAU 41 native to Western Ghats of India. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics** 91:1487-1495.
- Guerrero MGG (2023) Sporulation, Structure Assembly, and Germination in the Soil Bacterium *Bacillus thuringiensis*: Survival and Success in the Environment and the Insect Host. **Microbiology Research** 14:466-491.
- Ichikawa, Masayasu et al. (2008) Failure to phenotypically discriminate between non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strains with anticancer parasporins (PS2, PS3, and PS4) and *Bacillus thuringiensis* strains that produce insecticidal Cry proteins. **Applied entomology and zoology**, v. 43, n. 3, p. 421-426.
- Inouye K, Okumura S, Mizuki E (2008) Parasporin-4, a novel cancer cell-killing protein produced by *Bacillus thuringiensis*. **Food Science and Biotechnology** 17:219-227.
- Jackson, R. E. et al. (2007) Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 1, p. 180-186.
- Jiang K, Chen Z, Zang Y, Shi Y, Shang C, Jiao X, Cai J, Gao X (2023) Functional characterization of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* reveals the contributions of specific domains to its insecticidal activity. **Journal of Biological Chemistry** 299:1-

15.

Kapli, Paschalia; Yang, Ziheng; Telford, Maximilian J. (2020) Phylogenetic tree building in the genomic age. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 7, p. 428-444.

Katayama H, Yokota H, Akao T, Nakamura O, Ohba M, Mekada E, Mizuki E (2005) Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of biochemistry** 137:17-25.

Kitada S, Abe Y, Maeda T, Shimada H (2009) Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. **Toxicology** 264:80-88.

Kojima M, Abe S, Ueno T (2022) Engineering of protein crystals for use as solid biomaterials. **Biomaterials Science** 10:354-367.

Kondo S, Mizuki E, Akao T, Ohba M (2002) Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. **Parasitology research** 88:1090-1092.

Krishnan V, Domanska B, Elhigazi A, Afolabi F, West MJ, Crickmore N (2017) The human cancer cell active toxin Cry41Aa from *Bacillus thuringiensis* acts like its insecticidal counterparts. **Biochemical Journal** 474:1591-1602.

Kuroda, Shouta et al. (2013) Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. **Current microbiology**, v. 66, p. 475-480.

Laemmli, Ulrich K.; Favre, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4: I. DNA packaging events. **Journal of molecular biology**, v. 80, n. 4, p. 575-599.

Lee, Kwang Yong et al. (2004) Characteristics of Six New *Bacillus thuringiensis* Serovarieties: *B. thuringiensis* serovar. *coreanensis*, *leesis*, *konkukian*, *seoulensis*, *sooncheon*, and *yosoo*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 509-514.

Lenina, N. K. et al. (2014) Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. **3 Biotech**, v. 4, p. 545-551.

Loutfi H, Fayad N, Pellen F, Le Jeune B, Chakroun M, Benfarhat D, Lteif R, Kallassy M, Le Brun G, Abboud M (2021) Morphological Study of *Bacillus thuringiensis* Crystals

and Spores. **Applied Sciences** 11:155.

Marega, Gabriela Marques; De Almeida Marques, Míriam (2021) Desempenho de cultivares de milho na infestação e danos de insetos pragas e nas características fitotécnicas da cultura. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 2, p. 2736-2748.

Martins, Érica Soares et al. (2020) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, v. 40, n. 1, p. 65-68, 2007.

Mendoza-Almanza, Gretel et al. (2020) The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. **Toxins**, v. 12, n. 5, p. 301.

Meric G, Mageiros L, Pascoe B, Woodcock DJ, Mourkas E, Lamb S, Bowden R, Jolley KA, Raimundo B, Sheppard SK (2018) Lineage-specific plasmid acquisition and the evolution of specialized pathogens in *Bacillus thuringiensis* and the *Bacillus cereus* group. **Molecular ecology** 27:1524-1540.

Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, ParkYS (1999) Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell killing action on human cancer cells. **Journal of applied microbiology** 86:477-486.

Mizuki, Eiichi et al. (2000) Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 4, p. 625-634.

Moazamian, Elham et al. (2018) Anti-cancer parasporin toxins of new *Bacillus thuringiensis* against human colon (HCT-116) and blood (CCRF-CEM) cancer cell lines. **Current Microbiology**, v. 75, p. 1090-1098.

Nadarajah, Vishna Devi et al. (2008) Selective cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions. **Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 39, n. 2, p. 235.

Nagamatsu Y, Okamura S, Saitou H, Akao T, Mizuki E (2010) Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte

cancer and uterus cervix cancer cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry** 74:494-498.

Nair K, Al-Thani R, Al-Thani D, Al-Yafei F, Ahmed T, Jaoua S (2018) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology,  $\delta$ -endotoxins and cry gene content. **Frontiers in microbiology** 9:708.

Namba, Akitoshi et al. (2003) The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *coreanensis* A1519 strain against the human leukemic T cell. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1622, n. 1, p. 29-35.

Ohba, Michio; Aizawa, Keio. (1986) Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 47, n. 1, p. 12-20.

Ohba, Michio; Mizuki, Eiichi; Uemori, Akiko. 2009. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer research**, v. 29, n. 1, p. 427-433.

Okassov, Almas et al. (2015) Parasporins as new natural anticancer agents: a review. **J BUON**, v. 20, n. 1, p. 5.

Okumura, Shiro et al. (2008) Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. **Biotechnology annual review**, v. 14, p. 225-252.

Okumura S, Koga H, Inouye K, Mizuki E (2014) Toxicity of Parasporin-4 and health effects of pro-parasporin-4 diet in mice. **Toxins** 6:2115-2126.

Oliveira-Santos, Naiane et al. (2023) More than just an insect killer: The non-insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* with biotechnological potential. **Toxicon**, p. 107261.

Poornima, Kkani; Selvanayagam, P.; Shenbagarathai, R. (2010) Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 348-354.

Praça, Lilian Botelho et al. (2003) **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera.** Boletim de pesquisa e desenvolvimento 41 – Embrapa.

Qian J, Wang Y, Hu Z, Shi T, Wang Y, Ye C, Huang H (2023) *Bacillus* sp. as a microbial cell factory: Advancements and future prospects. **Biotechnology Advances** 69:108278.

Rezaei, Roya; Moazamian, Elham; Montazeri-Najafabady, Nima (2023) Parasporin-4, a novel apoptosis inducer of breast cancer cells produced by *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 5, p. 4469-4480.

Rodrigues, Cecilia Pessoa (2012) **Atividade in vivo de parasporina extraída de *B. thuringiensis* sobre o câncer colorretal murino (CT-26).** Monografia (Bacharel em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu

Rudd SR et al. 2023. The Parasporal Body of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis: A Unique Phage Capsid-Associated Prokaryotic Insecticidal Organelle. **Biology** 12:1421.

Sabiá Júnior, Elias Ferreira (2015) **Detecção e caracterização de proteínas parasporinas em *Bacillus thuringiensis*.** Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília.

Saitoh H, Okumura S, Ishikawa T, Akao T, Mizuki E, Ohba M (2006) Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a parasporal protein, parasporin-4, that preferentially kills human leukemic T cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry** 70:2935-2941.

Sambrook, Joseph; Russell, David W. (2001) Molecular Cloning-Sambrook & Russel Vol. 1, 2, 3. **Cold Springs Harbour Laboratory Press.**

Santos JR., H. J G. (2009) **Seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae) e populações de *Trichogramma* spp. (Westwood) (Hym.: Trichogrammatidae) para o controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae).** Tese (Dourado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Santos, Edclecia Nascimento (2018) Isolamento de *Bacillus thuringiensis* de amostra de solo e sua toxicidade sobre trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Universidade Estadual de Sergipe.

Santos, Edclécia N. et al. (2022) *Bacillus thuringiensis*: From biopesticides to anticancer agents. **Biochimie**, v. 192, p. 83-90.

Santos OM, de Lima FCDS, Martins L, Oliveira JFP, de Almeida LM, de Camargo Cancela M. (2023). Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia** 69:e-213700 DOI 10.32635/2176\_9745.RBC.2023v69n1.3700.

Sauka DH, Peralta C, Pérez MP, Onco MI, Fiodor A, Caballero J, Berry C, Del Valle EE, Palma L (2022) *Bacillus toyonensis* biovar *Thuringiensis*: A novel entomopathogen **Control** 167:104838.

Setlow Peter (2016) Spore resistance properties. **The bacterial spore: from molecules to systems** 201-215.

Silva-Brandao, Karina Lucas et al. (2018) Loci under selection and markers associated with host plant and host-related strains shape the genetic structure of Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0197378.

Soberón, Mario et al. (2018) Cell lines as models for the study of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 93, p. 66-78.

Šolinc G, Anderluh G, Podobnik M (2023) *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa forms filamentous oligomers when exposed to lipid membranes or detergents. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 674:44-52.

Souissi W, Alistair T, Domanska B, Fortea E, West MJ, Schwartz JL, Crickmore N (2022) Probing the Mechanism of Action of Cry41Aa on HepG2 through the Establishment of a Resistant Subline. **Toxins** 14:319.

Suárez-Barrera, Miguel O. et al. 2021. Genetic modification approaches for parasporins *Bacillus thuringiensis* proteins with anticancer activity. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7476.

Uemori, Akiko et al. (2007) Ubiquity of parasporin-1 producers in *Bacillus thuringiensis* natural populations of Japan. **Naturwissenschaften**, v. 94, p. 34-38.

Veit, Michael; Gadalla, Mohamed Rasheed; ZHANG, Minze (2022) Using Alphafold2 to Predict the Structure of the Gp5/M Dimer of Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 13209.

Velasquez, Luisa-Fernanda; Rojas, Dan'ithza S.; Cerón, Jairo A (2018) Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. **Revista Colombiana de biotecnología**, v. 20, n. 2, p. 89-100.

Xu C, Wang BC, Yu Z, Sun M (2014) Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. **Toxins** 6:2732-2770.

Wang J, Mei H, Zheng C, Qian H, Cui C, Fu Y, He J (2013a) The metabolic regulation of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* revealed by transcriptomics and proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics** 12:1363-1376.

Wang J, Mei H, Qian H, Tang Q, Liu X, Yu Z, He J (2013b) Expression profile and regulation of spore and parasporal crystal formation-associated genes in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Proteome Research** 12:5487-5501.

Wang K, Shu C, Bravo A, Soberón M, Zhang H, Crickmore N, Zhang J (2023) Development of an Online Genome Sequence Comparison Resource for *Bacillus cereus* sensu lato Strains Using the Efficient Composition Vector Method. **Toxins** 15:393.

Whiteley HR, Schnepf HE (1986) The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Reviews in Microbiology** 40:549-576.

Wiley, Edward Orlando; Lieberman, Bruce S. (2011) Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics. **John Wiley & Sons**.

Yousten, A. A. (1984) *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 3, p. 315-343.

Zhang, Jing et al. (2020) Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Serovar *coreanensis* ST7 with Toxicity to Human Cancer Cells. **Advances in Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 673-680.