UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DETECÇÃO, CLONAGEM E ANÁLISE *IN SILICO* DO GENE PARASPORINA 4 EM LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis*

Thais Nayara Ferreira dos Santos

Jaboticabal - SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DETECÇÃO, CLONAGEM E ANÁLISE *IN SILICO* DO GENE PARASPORINA 4 EM LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis*

THAIS NAYARA FERREIRA DOS SANTOS

Orientador(a): Profa. Dra. Janete Apparecida Desidério
Co-orientador(a): Mes. Raquel Oliveira Moreira

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal - SP
2º Semestre/2021

S237d

Santos, Thais Nayara Ferreira dos

Detecção, clonagem e análise in silico do gene parasporina 4 em linhagens de Bacillus thuringiensis / Thais Nayara Ferreira dos Santos. -- Jaboticabal, 2021

46 p. : fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Janete Apparecida Desidério

Coorientadora: Raquel Oliveira Moreira

1. Genética Molecular. 2. Bacillus thuringiensis. 3. Parasporina. 4. Parasporina 4. 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.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
Departamento: Biologia Aplicada à Agropecuária

CERTIFICADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Título: **Detecção, clonagem e análise *in silico* do gene parasporina 4 em linhagens de *Bacillus thuringiensis***

Acadêmica: Thais Nayara Ferreira dos Santos

Curso: Ciências Biológicas

Orientador: Profa. Dra. Janete Apparecida Desidério

Coorientadora: Me. Raquel Oliveira Moreira

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

Período: 2º semestre de 2021.

CONCEITO: **Aprovado**

Este trabalho é recomendado para compor a base de dados Repositório: SIM [■] NÃO [ ]
Reprovado [ ]

BANCA EXAMINADORA: Assinaturas

Presidente: Me. Raquel Oliveira Moreira

Membro: Prof. Dr. Jackson Antonio Marcondes de Souza

Membro: Me. Jardel Diego Barbosa Rodrigues

Jaboticabal: 22/07/2021

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 26/07/2021

Prof. Dr. Davi Rodrigo Rossatto
Vice-Chefe em Exercício do Departamento

“Um dia me disseram quem eram os donos da situação,
sem querer eles me deram as chaves que abrem essa prisão”

- Engenheiros do Hawaii

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, pela sabedoria, amor, paciência e oportunidades que Ele me deu e me dá.

Aos meus pais Nilza e Helder, que acreditaram no meu potencial e sempre me deram todo suporte e amor possível para que eu alcançasse meus sonhos. Sou grata por tudo que vocês já fizeram por mim. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, seja para sorrir, para chorar junto comigo, para me abraçar, me incentivar ou me dar bronca, vocês estiveram ali o tempo todo, me ensinando sempre, sendo meus exemplos e minha base, amo vocês.

A todos os meus parentes, mas em especial a minha tia Solange que desde sempre se orgulha de mim e faz de tudo para me ajudar e a minha tia Ivanice, que me deu acolhimento e amor principalmente nas horas difíceis.

Aos meus amigos que me deram tanto apoio e incentivo durante todo meu ensino, que foram tão companheiros, amorosos e eram alívio para os meus momentos difíceis, vocês deixaram meu trabalho e vida mais prazerosos.

Agradeço a todos meus professores que fizeram parte do meu processo de ensino, desde o ensino básico a graduação, muito obrigado por me proporcionarem ensino de qualidade e por ajudarem na formação do meu caráter. Vocês são os pilares da nossa sociedade, e foram incentivos para minha escolha pela Ciência e pesquisa.

Agradeço a minha orientadora Janete, por ter me aceitado como orientada, me tratado com tanto carinho, por ter me proporcionado muitos ensinamentos e por ter confiado em mim para realizar algo novo no laboratório, mesmo sabendo das dificuldades e limitações que poderíamos ter.

Agradeço a minha coorientadora Raquel que esteve dia a dia se preocupando com esse trabalho e comigo, dando toda atenção e ajuda possível, obrigada por tanta dedicação, paciência e sabedoria para me ajudar, sem você esse trabalho não seria possível.

Também agradeço a todos os meus companheiros do laboratório, mas principalmente ao Jardel, Higor, Bruno, Maria Helena e Rodrigo que tornaram meus dias mais leves e acolhedores durante meu trabalho.

Ao Hagabo e Renato por terem sido tão cordiais em ajudarem em etapas da minha pesquisa.

Agradeço a toda UNESP-FCAV, por ter florescido o ensino e a ciência dentro de mim, vocês me proporcionaram os melhores anos da minha vida, e me deram suporte para contribuir e retribuir para a ciência e tecnologia do mundo.

Á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxilio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - Processo n° 2019/21621-0.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que passaram na minha história e me ensinaram sobre a vida, seja pela dor ou pelo amor, vocês foram fundamentais para traçar minha jornada.

SUMÁRIO

RESUMO 9

ABSTRACT 10

1. INTRODUÇÃO 11

2. OBJETIVOS 13

2.1. OBJETIVOS GERAIS 13

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13

3. REVISÃO DE LITERATURA 14

3.1. *B. THURINGIENSIS*: TAXONOMIA E BIOLOGIA 14

3.2. *BACILLUS THURINGIENSIS*: PRINCIPAIS TOXINAS INSETICIDAS 15

3.2.1. PROTEÍNAS CRY (CRISTAL) 15

3.2.2. PROTEÍNAS VIP (PROTEÍNA INSETICIDA VEGETATIVA) 16

3.3. PROTEÍNAS PS (PARASPORINAS) 16

3.4. PARASPORINAS E O CÂNCER 21

4. MATERIAL E MÉTODOS 24

4.1. CULTIVO BACTERIANO 24

4.2. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE *B. THURINGIENSIS* 25

4.3. ISOLAMENTO PARCIAL DO GENE *PS4* POR PCR 26

4.4. CLONAGEM DO FRAGMENTO PARCIAL DO GENE *PS4* DE UMA LINHAGEM PADRÃO 27

4.5. CONFIRMAÇÃO DOS CLONES CONTENDO O GENE *PS4* POR PCR 29

4.6. SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL DO CLONE DE *E. COLI* POSITIVO PARA A PRESENÇA DO GENE PARCIAL *PS4* 30

4.7. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA OBTIDA 30

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 32

6. CONCLUSÃO 40

REFERÊNCIAS 41

Resumo

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria gram-positiva que possui suas linhagens estudadas principalmente para o controle de insetos-praga, devido à capacidade inseticida da maioria de suas proteínas (Cry e Vip). Porém, recentes estudos apontam a presença de outras proteínas com ação inseticida pouco conhecida, mas de grande importância nas pesquisas envolvendo este microrganismo. Essas proteínas denominadas Parasporinas (PS) possuem atividade citotóxica e apresentam seis subfamílias, sendo PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 e PS6, consideradas potenciais fármacos no tratamento do câncer. Dada a grande incidência de casos de câncer no mundo e a necessidade de novas alternativas de tratamento, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização de linhagens de *B. thuringiensis*, pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada da FCAV – UNESP, como potenciais fontes da proteína PS4, sendo essa a menos estudada dentre as subfamílias supramencionadas. A seleção das linhagens foi realizada por meio da técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) com primers específicos para o gene *ps4*, seguida pela clonagem e sequenciamento dos *amplicons* das amostras positivas, no sentido de se estabelecer uma análise *in silico* das sequências obtidas em comparação àquelas existentes no banco de dados GenBank. O presente estudo permitiu a seleção de uma linhagem portadora do gene *ps4,* denominada *B. thuringiensis coreanensis*, cuja sequência parcial do mesmo permitiu a análise de identidade com as sequências do banco de dados e a observação de que o gene *ps4* encontra-se localizado em um plasmídeo. Portanto, esta linhagem poderá ser fonte do gene para futuros experimentos de expressão e caracterização dos efeitos citotóxicos da Parasporina 4 frente a diferentes tipos de tumores.

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) is a gram-positive bacterium that has its strains studied mainly for the control of insect pests, due to the insecticidal capacity of most of its proteins (Cry and Vip). However, recent studies indicate the presence of other proteins with little known insecticidal action, but of great importance in research involving this microorganism. These proteins called Parasporins (PS) have cytotoxic activity and have six subfamilies, being PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 and PS6, considered potential drugs in the treatment of cancer. Given the high incidence of cancer cases in the world and the need for new treatment alternatives, this study aimed to characterize *B. thuringiensis* strains, belonging to the collection of the Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada at FCAV - UNESP, as potential sources of the PS4 protein, being the least studied as a subfamily. The selection of strains was performed using the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique with specific primers for the ps4 gene, followed by cloning and sequencing of the amplicons of the positive responses, in order to establish a sequence analysis in silico. compared to existing locations in the GenBank database. The present study appears to be the selection of a strain carrying the ps4 gene, called *B. thuringiensis coreanensis*, whose partial sequence of the same was carried out for identity analysis with the database sequences and the observation that the *ps4* gene is located on a plasmid. Therefore, this strain can be a source of the gene for future expression experiments and characterization of the cytotoxic effects of Parasporin 4 on different types of tumors.

1. INTRODUÇÃO

Conhecida por sua grande importância na agricultura, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) se mostra cada vez mais valiosa para estudos científicos. Essa bactéria tem sido amplamente estudada pela sua ação inseticida, sendo esta característica atribuída à presença de cristais endotóxicos, proteínas cyt e Vip, que são letais para algumas larvas de insetos pragas. Desta forma, *B. thuringiensis* é utilizado para o controle de pragas de diversas ordens como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera e Hymenoptera, possibilitando o controle de importantes pragas agrícolas como, por exemplo, *Spodoptera frugiperda, Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e vetores de doenças de importância mundial como as do gênero *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Diptera: Culicidae), atingindo também nematoides e caramujos (CAPALBO et al., 2005; DOMÍNGUEZ-ARRIZABALAGA, et al., 2020).

B. thuringiensis é encontrado principalmente em amostras de solo, de insetos vivos ou mortos e de grãos estocados. Além da facilidade em ser encontrado na natureza, *B. thuringiensis* possui uma diversidade genética muita grande, devido aos seus diversos plasmídeos, à sua transferência conjugal, à sua recombinação e fatores como mutação e influências nutricionais (CAPALBO et al., 2005).

Tendo em vista essa diversidade entre cepas de *B. thuringiensis* é possível descobrir e explorar novas toxinas com diferentes aplicações. Hoje a maioria das pesquisas é realizada envolvendo suas principais proteínas, Cry e Vip ambas de caráter inseticida (MENDOZA-ALMANZA et al., 2020). No entanto, atenção especial tem sido recentemente dirigida às proteínas Parasporinas que, diferente das outras acima citadas, possuem grande poder citotóxico e propriedades não hemolíticas (MENDOZA-ALMANZA et al., 2020).

Descobertas por pesquisadores japoneses no ano de 1999 estas proteínas são conhecidas atualmente de acordo com suas estruturas e níveis de atividade, sendo classificadas em seis subfamílias de Parasporinas, sendo PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 e PS6. Estas proteínas possuem citotoxicidade em células carcinogênicas humanas, atuando principalmente no controle de células cancerígenas hepáticas (HepG2), de colo uterino (HeLa e TCS), pulmonar (A549),

de colo retal (Caco – 2), em adenocarcinoma endomentrial (Sawano) e em células leucêmicas (MOLT-4, HL-60 e Jurkat) (OKASSOV et al., 2015). Entre essas subfamílias de Parasporinas, as mais estudadas são PS1 e PS3.

Vários estudos foram realizados sobre seus efeitos citocidas e muitos deles analisaram a especificidade dos receptores para as Parasporinas em células com mutações (ou mutadas). Esta especificidade pode estar relacionada à superexpressão 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).

Embora as subfamílias de Parasporinas possuam modo de ação e efetividade similares no controle de células carcinogênicas, são escassos os trabalhos sobre a Parasporina PS4, principalmente no Brasil. Assim, o presente estudo teve por objetivo a busca de possíveis linhagens de *B. thuringiensis* portadoras deste gene visando à identificação de novas subclasses de PS4, para posterior estudo da atividade citocida em diferentes tipos de câncer.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo visa realizar uma bioprospecção envolvendo linhagens de *B. thuringiensis* portadores do gene Parasporinas 4, buscando a caracterização de novas subclasses desse gene, tendo em vista sua potencial aplicabilidade no tratamento de diferentes tipos de câncer.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o gene da *parasporina 4* em linhagens padrão de *B. thuringiensis* por meio de PCR com primers específicos.
- Clonar os fragmentos obtidos a partir das amostras positivas provindas da PCR.
- Sequenciar os *amplicons* para confirmação da presença do gene de interesse.
- Realizar análise *in silico* a fim de se observar a identidade genética das sequências com aquelas presentes no banco de dados (Genbank).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *B. thuringiensis*: taxonomia e biologia

B. thuringiensis é uma espécie pertencente ao filo Firmicutes, classe Firmibacteria, ordem Eubacteriales, família Bacillaceae, possuindo várias subespécies. É uma bactéria gram-positiva, entomopatogênica, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, não-capsulada e móvel com flagelos peritricosos, presente em amostras de solo e trato digestivo de Arthopoda e outros invertebrados superiores (ROGOFF; YOUSTEN, 1969; WEI; HALE et al., 2003; MENDOZA-ALMANZA et al., 2020).

As subespécies de *B. thuringiensis* são agrupadas de acordo com suas propriedades bioquímicas e imunogênicas, na reação de aglutinação de antígenos flagelares das células vegetativas, possibilitando a obtenção de anticorpos (DE BARJAC & FRACHON, 1990). Desta forma, a espécie é dividida em 86 subespécies. Porém há algumas divergências para esse valor, devido a, por exemplo, algumas estirpes de *B. cereus* que possuem proteínas que reagem com soros específicos para *B. thuringiensis*, indicando falsos positivos (DE BARJAC & BONNEFOI, 1973) e a subespécies de *B. thuringiensis* sem flagelos que não entraram nessa classificação. Hoje, depois de várias pesquisas sobre as linhagens de *B. thuringiensis*, há uma estimativa de mais de 50.000 estirpes conhecidas no mundo (MONNERAT et al., 2001) e um número não conclusivo de subespécies.

Atualmente o uso de microrganismos entomopatógenos como agentes de controle biológico tem se mostrado de grande importância como alternativa ao controle químico de pragas, e o mais importante entre eles é a bactéria *B. thuringiensis*. Produtos baseados no uso de *B. thuringiensis* são os mais sucedidos no mundo com um ganho de 8 bilhões de dólares anuais. O que distingue esta bactéria dos outros membros do grupo *Bacillus* é a sua capacidade de produzir inclusões cristalinas parasporais. (DOMÍNGUEZ-ARRIZABALAGA et al., 2020)

Em relação ao ciclo de vida do *B. thuringiensis*, há uma divisão em duas fases, sendo uma de divisão celular vegetativa, na qual há a multiplicação por divisão binária, e uma fase de esporulação, dada pela formação do esporo,

estrutura germinativa liberada após a desintegração da parede celular e responsável por iniciar a fase vegetativa da bactéria em ambiente favorável ao crescimento. Durante a fase de esporulação ocorre também a produção de proteínas cristalinas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos polos da célula (LERECLUS, 1988; HÖFTE & WHITELEY, 1989; PEFERÖEN, 1997). Estes cristais são compostos por uma ou várias delta-endotoxinas altamente tóxicas e específicas (HERRERO et al., 2001, SIEGEL, 2001).

Além disso, *B. thuringiensis* também é capaz de produzir outras toxinas, como as α-exotoxinas, β-exotoxinas, hemolisinas, exoenzimas, quitinases, fosfolipases e proteínas inseticidas vegetativas (Vip) (HANSEN; SALAMITOU, 2000), todas de caráter inseticida.

Apesar do que se achava evolutivamente sobre a relação hospedeiro-parasita existente entre insetos e *B. thuringiensis*, estudos como de OHBA et al. (2009) demostraram que essa bactéria é apenas um organismo saprófita e não um patógeno obrigatório. A conclusão foi obtida após a confirmação da existência de maior número de proteínas Cry não inseticidas em *B. thuringiensis* (OHBA et al., 1986; HASTOWO et al., 1992; MAEDA et al., 2000; LEE et al., 2003; MENDOZA-ALMANZA et al., 2020). MIZUKI et al. (1999). Com a intenção de procurar atividades não inseticidas das proteínas Cry de *B. thuringiensis*, estes autores encontraram, após uma ampla varredura de estirpes, proteínas capazes de discriminar células T normais de células T leucêmicas, matando somente a linhagem tumorigênica. Essas proteínas Cry, com atividade anticancerosa, receberam o nome de Parasporinas e foram definidas como não hemolíticas e tóxicas, preferencialmente para células cancerosas (MIZUKI et al., 2000).

3.2. *Bacillus thuringiensis*: principais toxinas inseticidas

3.2.1. Proteínas Cry (Cristal)

Cry é uma proteína presente nas inclusões cristalinas parasporais liberadas durante a fase de esporulação do *B. thuringiensis*, que são sintetizadas por um

gene de mesmo nome; essas toxinas são altamente específicas para seus organismos-alvo (MENDOZA-ALMANZA et al., 2020). Elas são amplamente utilizadas no controle de insetos de ordens como Hymenoptera, Coleoptera, Homoptera, Orthoptera e Mallophaga, assim como nematóides, ácaros e protozoários. Graças à sua atividade tóxica, foi possível o controle biológico de pragas por meio de formulações de spray e plantações transgênicas que incorporam proteínas Cry ou algum fragmento ativo (MENDOZA-ALMANZA et al., 2020).

Segundo BRAVO (1997)**,** as inclusões cristalinas são ingeridas pelas larvas na forma de protoxinas e se tornam tóxicas após solubilização e clivagem por proteases do intestino do inseto. As toxinas se ligam às diferentes proteínas intestinais receptoras do inseto levando à formação de poros e indução da lise celular. Dessa forma, estudos mostram que diversos grupos de insetos são suscetíveis às toxinas Cry de *B. thuringiensis*.

3.2.2. Proteínas Vip (Proteína Inseticida Vegetativa)

Descritas por ESTRUCH et al. (1996), essas proteínas recebem o nome de Vip por serem produzidas na fase vegetativa de crescimento de *B. thuringiensis*. Em relação ao seu modo de ação, a Vip forma poros na membrana do epitélio do intestino médio, sendo tóxica a vários insetos pragas, principalmente àqueles pertencentes à ordem Lepidoptera (YU et al., 1997; LOGUERCIO et al., 2002; LEE et al., 2003. MENDOZA-ALMANZA et al., 2020). Muitos estudos estão sendo realizados em torno destas proteínas visando seu poder inseticida e como alternativa ao manejo da resistência dos insetos às toxinas Cry. Segundo FANG (2007), a descoberta dessas proteínas é uma das mais relevantes para as pesquisas envolvendo controle biológico de pragas.

3.3. Proteínas PS (Parasporinas)

A Parasporina foi definida como sendo uma proteína parasporal bacteriana capaz, preferencialmente, de matar células cancerosas, devendo-se notar que os termos Cry e PS não são mutuamente exclusivos e proteínas PS podem possuir atividade inseticida e citocida do câncer ao mesmo tempo (SOBERÓN et al., 2018, ABERKANE et al., 2020).

Assim como as toxinas Cry, as Parasporinas são moléculas sintetizadas como protoxinas, que compõem o cristal parasporal, e requerem processamento proteolítico para exercer todo o seu potencial citotóxico; porém, apesar da semelhança estrutural, estas apresentam apenas 25% de homologia com a sequência de aminoácidos das Cry e, por isso, receberam sistema de classificação distinto (MIZUKI et al., 2000; SAITOH et al., 2006; OHBA, et al., 2009; ABERKANE et al., 2020). Em 2010 foi estabelecido por OKUMURA et al. o Comitê de Classificação e Nomenclatura de Parasporina (http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/) a qual inclui seis subgrupos (PS1 a PS6), resumidos na Figura 1.

Figura 1: Classificação e características das proteínas PS. (---) Não determinado. (GARCÍA, 2016; OKUMURA et al., 2010).

Parasporina	Nomenclatura Cry	Cepa *Bt*	Gen (pb)	Pro-toxina (kDa)	Fragmentos tóxicos (kDa)	Proteasa	País	Referencia
PS1Aa1	Cry31Aa1	84-HS-1-11	2,169	81	66,58,56	Tripsina	Japón, Estados Unidos	(Mizuki et al., 2000)
PS1Aa2	Cry31Aa2	M15	2,226	83	55, 70	Tripsina	Canadá	(Jung et al., 2007)
PS1Aa3	Cry31Aa3	B195	2,169	81	56	Tripsina	Japón	(Uemori et al., 2008)
PS1Aa4	Cry31Aa4	Bt79-25	2,169	81	–	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake et al., 2008)
PS1Aa5	Cry31Aa5	Bt92-10	2,169	81	–	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake et al., 2008)
PS1Aa6	Cry31Aa6	64-1-94, M15, M019	2,262	70	15 y 55	Tripsina	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu et al., 2010)
PS1Ab1	Cry31Ab1	B195	2,178	82	56	Tripsina	Japón	(Uemori et al., 2008)
PS1Ab2	Cry31Ab2	Bt-31-5	2,178	82	–	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake et al., 2008)
PS1Ac1	Cry31Ac1	Bt-87-29	2,331	87	–	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake et al., 2008)
PS1Ac2	Cry31Ac2	B0462	2,331	87	15 y 607445	Proteinasa K	Japón	(Kuroda et al., 2013 – No publicado; Kuroda et al., 2013)
PS1Ad1	Cry31Ad1	64-1-94, M15, M019	2,262	73	14 y 59	Tripsina	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu et al., 2010)
PS2Aa1	Cry46Aa1	A1547, 4R2	1,014	37	30	Proteinasa K	Japón, Estados Unidos.	(Ito et al., 2004) (Brasseur et al., 2015)
PS2Aa2	Cry31Aa2	A1470	1,011	37	–	–	Japón	(Ishikawa et al., 2008 2013 – No publicado)
PS2Ab1	Cry31Ab1	TK-E6	912	33	29	Proteinasa K	Japón	(Hayakawa et al., 2007)
PS3Aa1	Cry41Aa1	A1462	2,475	88	64	Proteinasa K	Japón	(Yamashita et al., 2005)
PS3Ab1	Cry41Ab1	A1462	2,487	70	–	Tripsina	Japón	(Nagamatsu et al., 2010)
PS4Aa1	Cry45Aa1	A1470, T98+	2,487	30	26.8	Pepsina ó Proteinasa K	Japón	(Okomura et al., 2004)
PS5Aa1	Cry64Aa1	A1100	918	33	30	Proteinasa K	Japón	(Ekino et al., 2014)
PS6Aa1	Cry63Aa1	64-1-94, M15, 1019	2,259	85	14 y 59	Tripsina	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu et al., 2010)

A) PS1

A primeira Parasporina, denominada Parasporina 1 (PS1), foi isolada a partir da estirpe de *B. thuringiensis* A1190 em 2005 por Katayama e colaboradores. Esta apresenta uma identidade na sua sequência de aminoácidos com as sequências das proteínas inseticidas Cry e Cyt menor que 25% (VELASQUEZ et al., 2018).

PS1 é composta por uma protoxina de 81 kDa, que quando ativada por tripsina produz um fragmento de 15 kDa e outro de 56 kDa que formam um complexo ativo (Figura 2), sendo esses então, responsáveis pela atividade tóxica da PS1, quando em cultura, por mais de 20 horas, em células tumorais Hela (câncer cervical), células HL60 (leucemia promielocítica humana) e MOLT-4 (célula leucêmica humana) (KATAYAMA et al., 2005; SOBERÓN et al., 2018). Apresentam também efeito citotóxico contra células Sa-wano (células de câncer endometrial) e HepG2 (células de câncer de fígado) e nenhuma atividade tóxica contra células T obtidas de tecidos normais e linhas de células MRC-5 (VELASQUEZ et al., 2018).

B) PS2

Diferentemente da PS1, a PS2 não apresenta três domínios fazendo homologia às Cry inseticidas, porém, apresenta identidade com gene *cry* devido à presença de toxinas tipo MTX de *Lysinibacillus sphaericus* (ITO et al., 2004; AKIBA et al., 2009). A Parasporina 2 apresenta toxicidade contra células T leucêmicas, câncer de útero e câncer hepático.

A protoxina é de 37 kDa e é ativada no processamento proteolítico pela Proteinase K. A toxina ativa gera a formação de oligômeros nas regiões ricas em colesterol, que formam poros e consequentemente a lise celular, não ocorrendo apoptose (Figura 2). Estão envolvidas nessa atividade citotóxica as proteínas ancoradas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que possivelmente funcionam como

receptores dessa proteína (ITO et al., 2004; KITADA et al., 2009; AKIBA et al., 2009; SOBERÓN et al., 2018).

C) PS3

A Parasporina 3 (PS3), isolada de *B. thuringiensis* de solo japonês, foi identificada em uma única estirpe, *B. thuringiensis* A1462 (MIZUKI et al*.,* 1999). Esta, da mesma forma que as outras protoxinas de *B. thuringiensis*, precisa ser clivada proteoliticamente para tornar-se uma toxina ativa; sendo assim, são produzidas formas ativas da toxina com massa molecular de 64 kDa quando são clivadas por proteinase K em suas porções N- terminais (Figura 2) (YAMASHITA et al., 2000; SOBERÓN et al., 2018).

Em relação à ação da PS3 na morte celular, tem-se a hipótese de que a mesma produza morte necrótica devido à formação de poros na membrana plasmática das células cancerosas, tendo como evidência testes *in vitro* que mostraram que a PS3Aa1 aumentava a permeabilidade do plasma (VELASQUEZ et al., 2018).

D) PS4

A PS4 possui uma protoxina de 34 kDa com 3 domínios e apresenta homologia de sequência com a toxina Epsilon (ETX) (21%) e a toxina Aerolisina (10%), semelhante à observada no grupo PS2 (VELASQUEZ et al., 2018). É ativada pela Proteinase K e produz uma toxina de 27 kDa (SOBERÓN et al., 2018) que, segundo OHBA et al. (2009), é tóxica às células T leucêmicas, células de câncer de cólon e do câncer do colo do útero (Figura 2). Diferentemente da PS2, não necessita do colesterol para gerar poros. Apesar de apresentar três sequências relatadas no GenBank (AB180980.1; KC832500.1; KC832499.1), apenas uma foi descrita e caracterizada, sendo esta a PS4Aa1, produzida pela cepa A1470 (OKUMURA et al., 2004).

Esta Parasporina não possui blocos conservados nem estrutura típica das proteínas inseticidas Cry-3d (OKUMURA et al., 2006), além disso é a única

solubilizada em pH ácido, pois apresenta aumento de 25% em seu efeito citotóxico para várias linhagens celulares, em comparação com sua atividade após solubilização em tampão carbonato (VELASQUEZ et al., 2018).

E) PS5

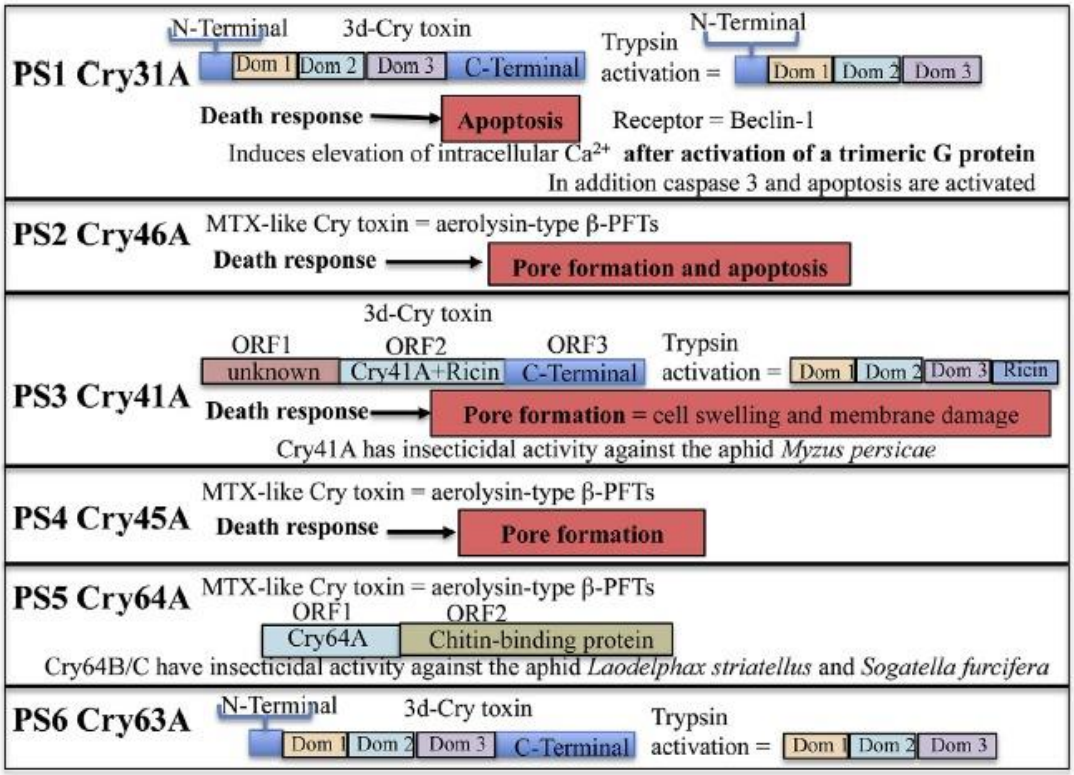
A PS5 (Cry64Aa) foi isolada e purificada da cepa *B. thuringiensis* tohokuensis A1100 por EKINO et al., (2014) e mostra atividade citotóxica contra células-T humanas com leucemia (MOLT-4). Tem uma massa molecular de 33,8 kDa na sua forma de protoxina, e quando clivada pela proteinase K produz um fragmento de 29,8 kDa (Figura 2) (VELASQUEZ et al., 2018).

F) PS6

Isolada das cepas *B. thuringiensis* M109 e CP84 (NAGAMATSU et al., 2010), a PS6 se trata de uma toxina Cry com 3 domínios (Figura 2) que apresenta 56,4% de identidade com as proteínas inseticidas Cry2 (XU et al., 2014), tem maior atividade citotóxica em relação às células HepG2 e HeLa (NAGAMATSU et al., 2010).

As protoxinas de PS1 e PS6 estão relacionadas entre si em alguns aspectos, uma vez que compartilham sequências conservadas em seus primeiros 50 resíduos de aminoácidos (LENINA et al., 2014). Ainda há poucos estudos acerca do seu mecanismo de ação e efeito citotóxico (VELASQUEZ et al., 2018).

Figura 2. Características dos seis diferentes grupos de Parasporinas. PS1 (Cry31A), PS3 (Cry41A) e PS6 (Cry63A) pertencem às toxinas 3d-Cry. PS2Aa1 (Cry46Aa1), PS4 (Cry45A) e PS5 (Cry64A) pertencem às toxinas Cry semelhantes a Mtx (Sobéron et al., 2018).



3.4. Parasporinas e o Câncer

O câncer é uma das principais doenças não transmissíveis que mais causam óbito no mundo (ABOUL-SOUD et al., 2019). Segundo a União Internacional de Controle do Câncer (UICC) houve um número estimado de 9.555.027 de mortes por câncer no mundo no ano de 2018 e esse número tende a aumentar 71,5% até 2040. O UICC ainda mostra que o número de casos de morte por câncer no Brasil foi de 243.588 em 2018.

O Brasil tenta lutar contra o câncer, desde o século 20, e anteriormente tratava-se mais sobre diagnóstico e tratamento, devido ao pouco conhecimento sobre o funcionamento biológico da doença em si (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 1999). De acordo com a WHO, o câncer tem maior prevalência em lugares desenvolvidos, pois os países subdesenvolvidos possuem maior incidência de doenças transmissíveis.

Os países desenvolvidos apresentam um predomínio em tipos de câncer relacionados ao desenvolvimento e urbanização como o de pulmão, reto, cólon,

próstata e mama, enquanto em países em desenvolvimento, a prevalência é de cânceres associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado). De modo geral, os tipos de câncer com maior incidência no mundo em 2018 foram o de mama, próstata, fígado, colo retal, cervical, estômago, rim, corpo do útero, tireoide, e de ovário.

Com o aumento esperado dessas neoplasias novas formas de tratamento estão sendo estudadas, como imunomodulação, uso de células T-CAR, imunoterapia combinada, etc (ABOUL-SOUD et al., 2019).

Apesar dos avanços no tratamento do câncer, a taxa de mortalidade devido a esta doença ainda é muito alta. Devido ao desenvolvimento de resistência por células cancerosas às drogas quimioterápicas atuais, há uma necessidade urgente de adicionar novas armas ao arsenal de drogas anticâncer para lutar contra esta doença mortal.

Proteínas de inclusão parasporal de *B. thuringiensis* com citotoxicidade contra células cancerosas específicas, aliada ao baixo custo de produção industrial podem se tornar promissoras no desenvolvimento de drogas anticancerígenas. A natureza termoestável das proteínas PS em solução aquosa as torna adequadas para a produção industrial. A variabilidade na riqueza de aminoácidos encontrada entre as diferentes classes de proteína Parasporinas, como as Parasporinas 1 e 3 que se mostram ricas em leucina e as Parasporinas 4 e 6 em glicina e iso-leucina, respectivamente, pode categorizá-las como proteínas anticâncer em potencial, haja vista que a proteína anticâncer tende a ser rica nesses aminoácidos (TYAGI et al., 2013).

A aplicação das Parasporinas como mais uma alternativa para a terapia do câncer está embasada nos trabalhos desenvolvidos com culturas de células *in vitro*. Os efeitos destas proteínas foram estudados em Câncer cervical, Câncer endometrial, Câncer colorretal, Câncer de mama, Leucemia linfoblástica aguda, Leucemia promielocítica e Câncer de fígado (OKASSOV et al*.,* 2015; ABOUL-SOUD et al., 2019). Esses estudos se tornam promissores e podem resultar em um tipo de terapia mais acessível quando o objetivo é utilizar a biodiversidade bacteriana como fonte de moléculas que poderão ser utilizadas no desenvolvimento de drogas contra os diferentes tipos de câncer.

No entanto, embora as proteínas Parasporinas tenham citotoxicidade específica para diferentes linhagens de células cancerosas estas não podem ser usadas diretamente para tratamentos devido às reações imunológicas imprevistas aos pacientes. Isso requer um estudo detalhado da função-estrutura molecular envolvendo a ação única da Parasporina. São necessários estudos *in sílico* para elucidar a composição, orientação estrutural da proteína Parasporina quando da interação com a células cancerígena, a estrutura de domínio funcionalmente modular da toxina e a avaliação de segurança dessas proteínas precisa ser realizada em uma variedade maior de espécies não-alvo para demonstrar experimentalmente sua especificidade e segurança (AKTARA et al., 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto 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 Apparecida Desidério e da doutoranda Raquel Oliveira Moreira.

4.1. Cultivo bacteriano

As cepas de *B. thuringiensis* utilizadas neste trabalho consistiram de 64 linhagens elites (Tabela 1), as quais foram retiradas do estoque, onde são mantidas a temperatura ambiente na forma de papéis filtro impregnadas com uma suspensão de esporos em água deionizada estéril. O volume de 1µL da suspensão de esporos foi estriado em placas de Petri contendo meio de cultura sólida BHI "*Brain Heart Infusion Broth*" (Himedia) e acondicionadas em estufa a 30ºC por pelo menos 16h.

Tabela 1. Lista de linhagens padrões presentes no banco de isolados do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA)

B.t. alesti T03 001	*B.t. aizawai* T07 001	*B.t. amagiensis*
B.t. thuringiensis T01 001	*B.t. neoleonensis* T24 001	*B.t. cameroun*
B.t. kumamotoensis	*B.t. coreanensis* T25 001	*B.t. konkukian*
B.t. indiana	*B.t. silo* T26 001	*B.t. monterrey*
B.t. tochigiensis	*B.t. entomocidus* T06 A001	*B.t. leesis*
B.t. canadensis	*B.t. shandongiensis* T22 001	*B.t. seoulensis*
B.t. pakistani T13 001	*B.t. pondicheriensis* T20 A001	*B.t. jinghongiensis*
B.t. sotto T04 001	*B.t. mexicanensis* T27 001	*B.t. oswaldocruzi*
B.t. tohokuensis	*B.t. ostridial* T08 A001	*B.t. higo*

B.t. dakota	*B.t. japonensis* T23 001	*B.t. malayensis*
B.t. israelensis T14 001	*B.t. nigeriensis* T08 B001	*B.t. andalonsiensis*
B.t. israelensis SPS1 (Bti ES)	*B.t. dendrolimus* T04 A001	*B.t. novosibirsk*
B.t. tenebrionis	B.t. kyushuensi T11 A001	*B.t. brasiliensis*
B.t. darmstadiensis T10 001	*B.t. londrina* (Br 33)	*B.t. kurstaki* cry (-) B*B.t.* 90 pig+
B.t. finitimus T02 001	*B.t. kurstaki* (HD73)	*B.t. thuringiensis* T01 328
B.t. kurstaki (HD1)	*B.t. kenyae* T04 A001	*B.t.* HD125
B.t. morrisoni T08 001	*B.t. toyamensis*	*B.t. kurstaki* 2
B.t. toumanoffi T11 001	*B.t. fukuokaensis* T03 C001	*B.t. wuhanensis* HD525
B.t. galleriae T05 001	*B.t. colmeri* T21 001	*B.t.* LM79 (~*B.t tenebrionis*)
B.t. thompsoni T12 001	*B.t. yunnanensis* T20 001	
B.t. tolworthi T09 001	*B.t. sumiyoshiensis* T03 B001	
B.t. subtoxicus T06 001	*B.t. tonguchini*	

4.2. Extração de DNA total de *B. thuringiensis*

O DNA total das linhagens de *B. thuringiensis* foram extraídos 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 colônias foi feita com uma alça de cromo-níquel e adicionadas a 200µL de água deionizada estéril em tubo de polipropileno de 1,5 mL. Os tubos foram posteriormente colocados em freezer -80ºC por 20 minutos. Após o congelamento, os tubos foram colocados em água fervente (100ºC) 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 ºC até a sua utilização. A quantificação do material proveniente das extrações 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 das amostras de DNA.

4.3. Isolamento parcial do gene *ps4* por PCR

Para a otimização da PCR, foi escolhido a linhagem padrão *B. thuringiensis* subspécie *shandogiensis* como controle positivo para o gene *ps4*, dado ser a primeira linhagem descrita como portadora deste gene, cuja sequência completa está disponível no GenBank sob o número de acesso AB180980. Para verificar a presença do gene de Parasporina no DNA extraído, foram utilizados na PCR convencional os iniciadores para *ps4*, descritos por CHUBICKA et al. (2018), sendo 5'TGGTGTGCTGCAAGGGGATA'3 a sequência do iniciador direto e 5'CCGCTTGGTAGCGAAACTGG'3 a sequência do iniciador reverso, que geram um *amplicon* de 736 pb.

Condições de PCR com diferentes concentrações de reagentes e temperatura de anelamento dos iniciadores foram testadas até encontrar a que melhor amplificasse os fragmentos com tamanhos esperados. Sendo assim, a reação para detecção do gene escolhida foi composta por 2 µl de DNA genômico (100 ng/µL), 1 µL de iniciador reverso (10 pmol), 1 µl de iniciador direto (10 pmol), 1 µl de dNTPs (10 mM), 2,5 µl de tampão 10X, 1 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 1µL de Taq Polimerase (0,3 U/µL) e água deionizada estéril q.s.p para 25 µL de reação.

As condições de amplificação basearam-se nas etapas de desnaturação inicial a 72ºC por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 72ºC por 1 min, anelamento a 59ºC por 1 min, extensão a 94ºC por 1 min e ao final dos ciclos, extensão final a 94ºC por 10 min. As amostras foram visualizadas e analisadas em géis de agarose 1%, utilizando-se de 5 µL 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%).

Os géis, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL) foram submetidos à eletroforese horizontal a 80 V por 2 h, 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). Os

fragmentos amplificados foram comparados com o marcador de tamanho molecular “1kb DNA ladder” (Fermentas), o qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos após a reação de PCR. Os géis de agarose foram visualizados 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”.

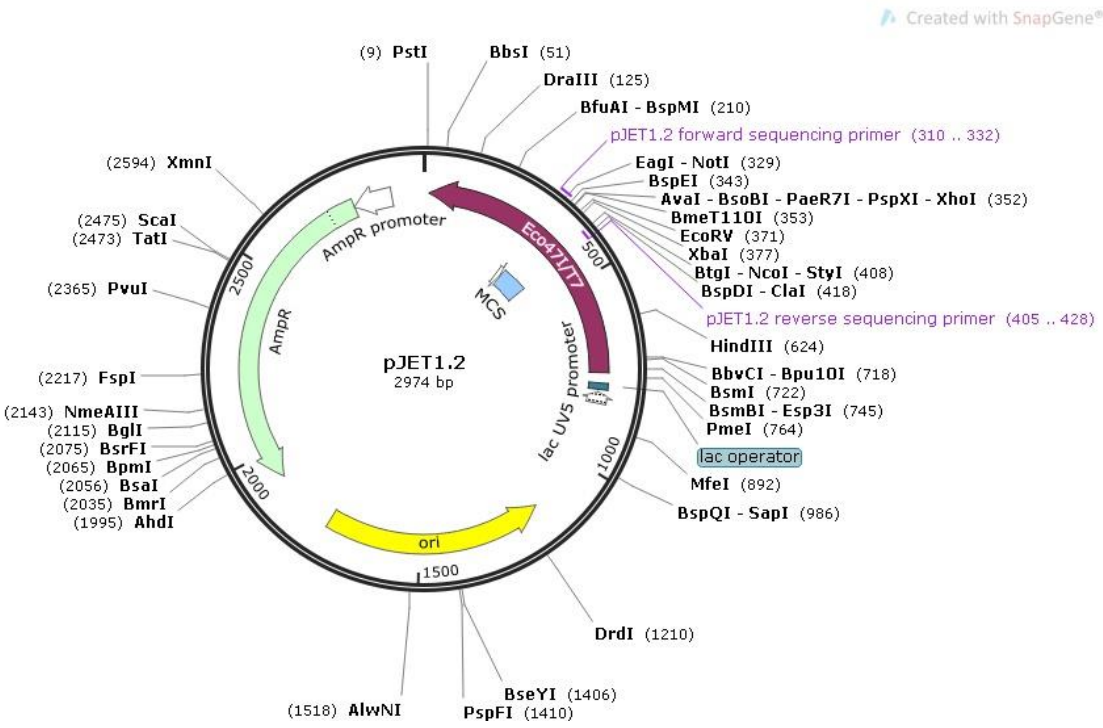
4.4. Clonagem do fragmento parcial do gene *ps4* de uma linhagem padrão

Dentre as cepas de *B. thuringiensis* presentes na coleção, o segmento de DNA amplificado na linhagem *B. t. coreanensis* foi purificado e clonado para confirmação da identidade gênica por sequenciamento.

O produto de PCR foi purificado usando o QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria pelo aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) e a integridade foi analisada em gel de agarose a 1%, conforme detalhado no item 4.3.

Após o procedimento de purificação, o *amplicon* foi clonado utilizando o CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, código K1232) (Figura 3), um sistema de clonagem compatível com todas as cepas de *E. coli* comuns de laboratório. O pJET1.2/ blunt fornecido no kit é um vetor de clonagem linearizado, de 2974 pb, que aceita a inserção de *amplicons* de 6 bp a 10 kb. Tal vetor possui um gene letal denominado *eco47IR* que é interrompido após a ligação do inserto alvo no seu sitio de clonagem, fazendo com que apenas células com plasmídeos recombinantes sejam capazes de se propagar. Para clonar o produto de PCR com extremidades 3´A geradas pela *Taq* DNA polimerase, as indicações do fabricante conforme descrito no *Sticky – End Cloning Protocol* foram seguidas.

Figura 3. Mapa do vetor pJET 1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific).



(Fonte:https://www.snapgene.com/resources/plasmid/files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pJET1.2).

As células de *E. coli* DH5 foram utilizadas para a transformação por meio do método de choque térmico de HANAHAN (1983), na qual foi adicionado 2 µL de *amplicon* em 50 µl de células competentes, posteriormente deixado em banho de gelo por 25 minutos. Após foi colocado por 2 minutos no banho a 42 ºC, e passado rapidamente para o gelo permanecendo por 2 minutos. A seguir foi adicionado 800 µl do meio SOC (20 g de Triptona /L; 5 g Extrato de levedura/L; 0,5 g NaCl /L; 2,5 Mm de KCl; 7 mM de $MgCl_2$; 20 mM Glicose; pH 7,0) a 37 ºC e foi deixado sob agitação por aproximadamente 1 hora.

Por fim foram selecionadas em placas de LB 2x (10 g de triptona/L, 5 g de extrato de levedura/L e 5 g de NaCl/L, pH 7,0 e adição de 1,5 % de ágar), contendo 100 µg ampicilina/mL.

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 12 h 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 através da lise alcalina com SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001). Posteriormente, a cultura restante referente aos clones foi alíquotada em 700 µL e assepticamente estocada em glicerol (100%) estéril, sendo mantidas em ultra-freezer a -80º C.

O DNA plasmidial obtido foi quantificado em espectrofotômetro e posteriormente foi armazenado a -20ºC até os testes de confirmação dos clones contendo o gene *ps4*.

4.5. Confirmação dos clones contendo o gene *ps4* por PCR

O DNA plasmidial dos clones foram utilizados em reações de PCR com os oligonucleotídeos específicos do gene *ps4* citados no item 4.3 permitindo visualizar presença ou ausência do inserto através do produto amplificado. As reações e os ciclos de amplificação estão descritos no item 4.3.

O vetor pJET/blunt contém um sítio de clonagem múltipla expandido, bem como um promotor T7 para a transcrição *in vitro*. Portanto, além dos oligonucleotídeos já descritos para o gene de interesse, também foi utilizado oligonucleotídeos presente no vetor pJET/blunt (pJET 1.2 Forward Sequencing Primer e pJET 1.2 Sequencing Reverse Primer) para verificar se o gene estava clonado na fase de leitura correta do promotor. As reações e os ciclos utilizados foram as indicadas no manual do vetor, optando pelo uso da GoTaq® Green Master Mix (Promega) e 1,5 µL de DNA plasmidial a 500ng/µL.

Após eletroforese e visualização em luz U. V. e confirmação do tamanho esperado, a amostra referente ao DNA plasmidial do clone positivo foi encaminhada para a confirmação por sequenciamento.

4.6. Sequenciamento do DNA plasmidial do clone de *E. coli* positivo para a presença do gene parcial *ps4*

A amostra de DNA plasmidial provinda da clonagem e com *amplicon* confirmado foi utilizada como molde nas reações de sequenciamento utilizando os iniciadores referentes vetor pJET1.2/ blunt. O sequenciamento foi feito no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), sediado na UNESP – Câmpus de Jaboticabal, através do sequenciador automático de primeira geração (Método de Sanger) com 96 capilares, ABI 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, CA). As corridas foram efetuadas em capilares de 50 cm utilizando o polímero POP7, o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e controle interno com DNA de pGEM™-3Zf(+) fornecidos pela Applied Biosystems.

4.7. Análise da sequência obtida

A sequência parcial obtida do gene *ps4* foi primeiramente editada a partir do programa *Bioedit*, na qual foi retirada a sequência relativa ao vetor, mantendo somente a região que foi devidamente sequenciada e que não possuía a presença de "*gaps"*.

Em seguida realizou-se uma comparação da sequência editada com o banco de dados, através da ferramenta *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) e dentro da mesma foi utilizado o algoritmo *blastn,* para a comparação de identidade entre sequências no banco de dados de sequências de nucleotídicas e *blastx* para a comparação de identidade entre sequências traduzidas, em todos os quadros de leitura, contra um banco de dados de proteínas, para que dessa forma, fosse confirmado o gene de interesse.

Para a construção da árvore baseada em distância foi utilizado o método Neighbour-Joining através da ferramenta BLAST, em que foi disposta a sequência obtida neste trabalho com aquelas do alinhamento realizado no algoritmo *blastn*. Estas sequências são parciais e também completas de *ps4* presentes no banco de

dados, juntamente às sequências de Cry45 e um grupo externo do gênero *Bacillus* de outra espécie.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de DNA extraídas das linhagens de *B. thuringiensis* foram quantificadas e apresentaram relação de absorbância 260/280 nm dentro da faixa de 1,8 a 2,2, tidas como de alta qualidade e concentrações adequadas sendo que, para uso na PCR, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 100 ng/µL

A análise das reações de PCR em géis de eletroforese permitiu observar que, de 64 linhagens padrão testadas, apenas duas linhagens apresentaram o fragmento de DNA amplificado com tamanho esperado de 736 pb.

Uma delas foi a linhagem *B. thuringiensis* subespécie *shandongiensis*, já descrita na literatura como portadora do gene *ps4* e, portanto, utilizada como controle positivo na reação com iniciadores específicos do gene (OKUMURA et al., 2006). A outra cepa que apresentou produto de amplificação para o fragmento do gene *ps4* foi a linhagem *B. thuringiensis* subespécie *coreanensis*, ainda não descrita como portadora do referido gene (Figura 4). Quanto nas outras 62 linhagens de *B. thuringiensis* extraídas e verificadas por PCR, verificou-se ausência de amplificação (Figura 5).

Figura 4. Eletroferograma evidenciando o fragmento amplificado de 736 pb do gene *ps4*. MM: Marcador molecular 1 kb DNA Ladder Fermentas. CP: Controle positivo representado pelo *B. thuringiensis* subespécie *shandongiensis*. 25: *B. thuringiensis* subespécie *coreanensis*. CN: Controle negativo da reação.

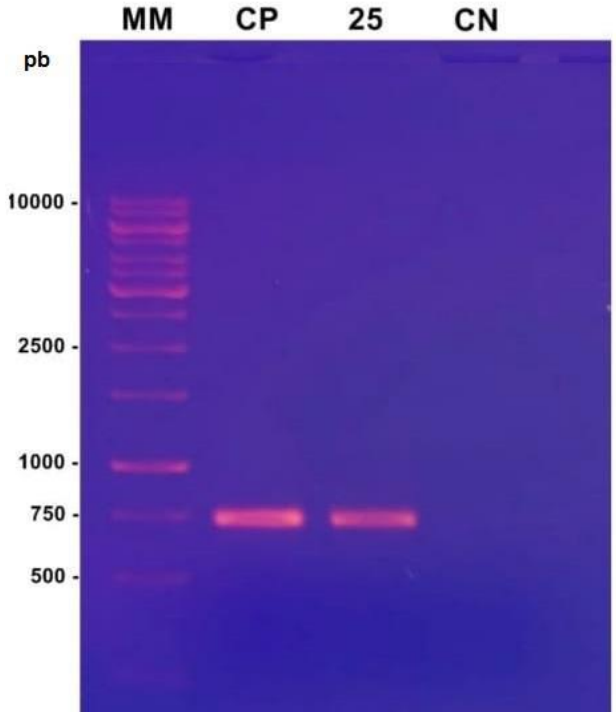
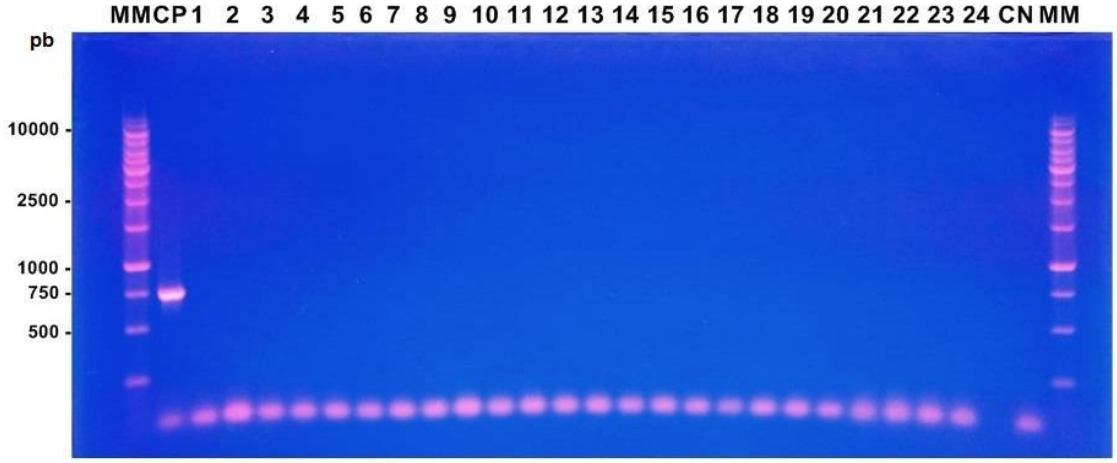


Figura 5. Eletroferograma evidenciando o produto amplificado do gene *ps4* na linhagem considerada controle positivo e a ausência do mesmo em uma mostra de linhagens de *B. thuringiensis*. MM: Marcador molecular 1 kb DNA Ladder Fermentas; CP: linhagem de *B. thuringiensis* subespécie *shandongiensis*. Canaletas 1 a 24: linhagens elite pertencentes à coleção do LGBBA.



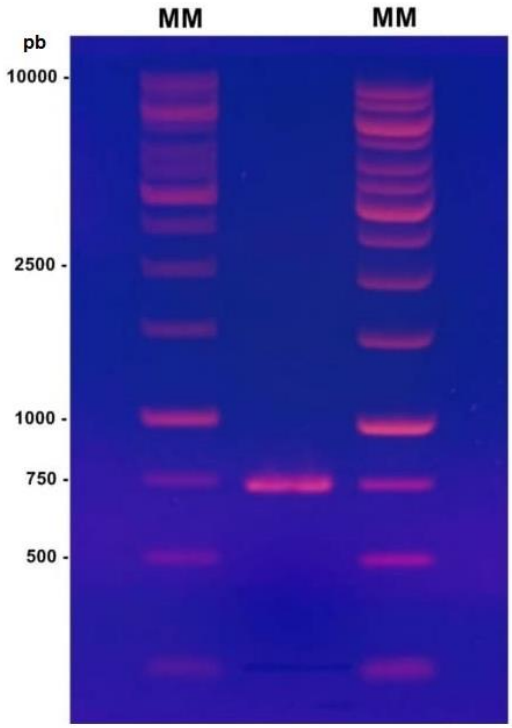
Com base nesses resultados pode-se inferir que não é comum encontrar estirpes portadoras do gene em estudo, sendo um gene de Parasporina pouco

estudado e com apenas uma subclasse descrita. Estes resultados corroboram os encontrados por GONZALES et al. (2011), SABIÁ JÚNIOR, (2015) em que trabalharam com diferentes genes de Parasporinas e também apresentaram poucas amplificações para o gene *ps4* ou nenhuma, classificando-a como uma proteína relativamente rara em *B. thuringiensis*. CHUBICKA et al. (2018) e ABOUL – SOUD et al. (2019), onde a triagem em um total de 70 e 9 estirpes, respectivamente, confirmou entre 0 a 23% a presença do gene *ps4*, também reforçando o resultado encontrado.

Duas características de estirpes com atividade de Parasporinas são que as mesmas dificilmente produzem proteínas inseticidas e/ou hemolíticas (MIZUKI et al., 2000; KITADA et al., 2006; AKIBA e OKUMURA, 2017). Mesmo não excluindo a possibilidade de algumas estirpes apresentarem simultaneamente atividades inseticidas e citocida (AKIBA e OKUMURA, 2017), percebe-se que triagens na coleção de isolados devem ser exploradas. Linhagens padrão são reconhecidas por serem eficientes como larvicidas ou hemolíticas, tornando a confirmação de genes associados às proteínas Parasporinas mais complexa.

Como a linhagem *B. thuringiensis coreanensis* apresentou amplificação para o gene *ps4* e esta ainda não havia sido relatada até o presente momento, buscou-se isolar e clonar este gene parcial a fim de realizar o sequenciamento e verificar a identidade deste frente à linhagem padrão controle positivo, cuja sequência é a única completa disponível no GenBank, sob número de acesso AB180980, e outras sequências parciais presentes no banco de dados. Assim, o fragmento isolado por iniciadores específicos do gene *ps4* foi purificado (Figura 6) e utilizado para transformar células competentes de *E. coli* para clonagem no vetor Clone JET PCR.

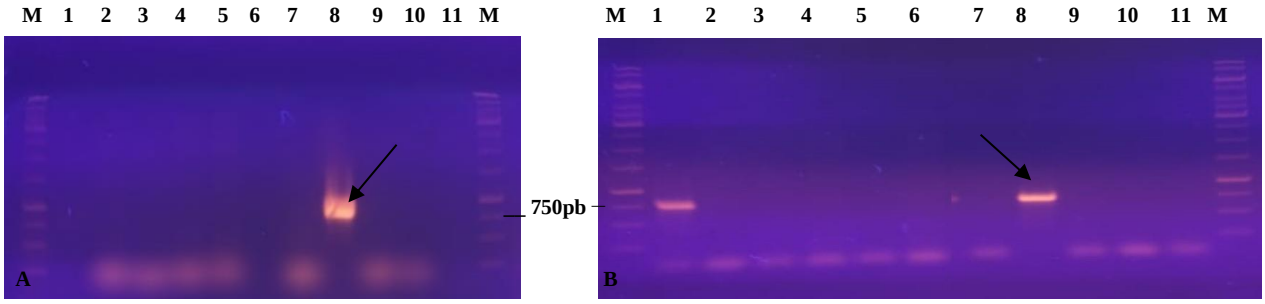
Figura 6. Eletroferograma evidenciando o fragmento amplificado do gene *ps4* de *B. thuringiensis* subespécie *coreanensis* e purificado para a clonagem em *E.coli*. MM: marcador molecular 1kb DNA ladder Fermentas.



Oito clones apenas foram obtidos na transformação por choque térmico para o gene *ps4* e, entre estes, apenas um plasmídeo confirmou a presença do gene (Figura 7). A amostra denominada “DNA plasmidial 11” amplificou utilizando tanto os oligonucleotídeos específicos para o gene *ps4* quanto utilizando os oligonucleotídeos do vetor pJET. A baixa eficiência da clonagem pode estar associada a viabilidade do kit comercial usado, interferindo negativamente nas atividades da enzima T4 ligase e do vetor. Outro fator é que o controle positivo para a PCR fornecido no kit não apresentou amplificação (Figura 7), concluindo assim o agravante dessa viabilidade em todos os componentes do kit em questão.

Figura 7. Eletroferogramas para a confirmação da clonagem do gene *ps4* (736 pb) ligado ao vetor pJET. O plasmídeo 11 (canaleta 8) amplificou utilizando os iniciadores para o próprio vetor de pJET (A) e confirmando a orientação correta para a clonagem, além de evidenciar a amplificação com os iniciadores específicos para o gene *ps4* (B). A: M - Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 - controle positivo disponibilizado no kit do vetor (não houve amplificação devido a validade do kit estar extremamente excedida); 2 a 11 – clones obtidos na clonagem. B: M - Marcador Molecular 1 kb DNA

Ladder (GeneRuler™); 1 - controle positivo referente ao DNA genômico da linhagem *B. thuringiensis shandongiensis*; 2 a 11 – clones obtidos na clonagem.



O gene *ps4* completo de *B. thuringiensis shandongiensis* compreende as posições 113 a 940 pb da sequência AB180980 do banco de dados com 827 pb e o fragmento amplificado pelo par de iniciadores PS4F e PS4R, utilizados neste trabalho, gerou um produto de 736 pb. Após sequenciamento e edição da sequência pelo programa Bioedit foi possível obter a sequência de nucleotídeos de 501 pb apresentada na Figura 8.

Figura 8: Sequência parcial (501 pb) do produto da amplificação do gene *ps4* da linhagem padrão *B. thuringiensis coreanensis* pertencente à coleção do LGBBA.

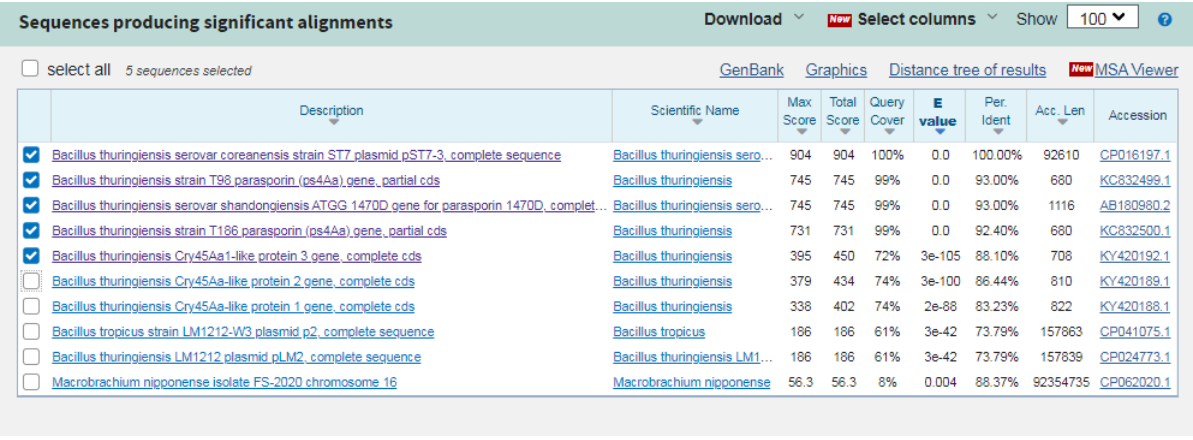
>ps4_seq
TCAACTAGTCAGCCTATAGTCAGAACGATTACATTTAATGAAACGCTTACTGATTCACAGTCTAC
AACAACAGAACATGGTATCACAGCTGGAGTAAGTGCGACAGTAAAAAGTGAAGCGGGATTTGT
TTTTGCAAAGGTAGGTTTTGAAGTTACGGTTTCATTTCAATACAATTACACGACTACAAACACAT
ATACGACAGAAACGTCTCGGAGTTGGACAGATTCGCTTCAAGTCACCGTTCCGCCAGGTTATG
TAACGGAACATACATTTATTGTGCAAACTGGTCCATATAGTAAAAATGTAGTATTAGAGGCTGA
CATAGCAGGACATGGATGGTTTAATTATAGGGCTCCTGGTTATACTGCTACTGGAATAGTTAAT
ATCACACGAGTATTATATGACAATAAGGTTCCAGGCATTACTCCCTATCCAGACGATTTCTATG
CTCGATTCAGAGGTTCAGGAAAGTTAGAAGGAAAAATGGGACTTCAATCTTTT

Utilizando a sequência obtida nesse trabalho, verificou-se, por meio do algoritmo BLAST *(blastn)*, que a mesma apresenta 100% de identidade com a sequência presente no plasmídeo pST7-3, anotada como uma “proteína

hipotética” (Figura 9). Este plasmídeo foi completamente sequenciado e pertence à linhagem de *B. coreanensis* cepa ST7 que teve seu genoma completo sequenciado e depositado no GenBank sob número de acesso em 23 de junho de 2016 pelo autor: Zhu,J. Rice Research Institute, Sichuan. Agricultural University, Huiming, Wenjiang, Sichuan 611130, China. O sequenciamento foi realizado a partir do DNA genômico e consta de 5.665.360 bp. A sequência do plasmídeo pST7-3 apresenta 92.610 pb e está depositado no GenBank sob número de acesso CP016197.1.

Quando comparada à única sequência completa de gene *ps4* disponível no banco de dados referente à linhagem *B. thuringiensis shandongiensis* (AB180980), utilizada como controle positivo, a sequência obtida neste trabalho apresentou 93% de identidade, assim como quando comparada à sequência parcial de *ps4* de uma cepa de *B. thuringiensis* denominada T98. E 92,40% de identidade foi observada com outra sequência parcial de *ps4* da cepa T186 de *B. thuringiensis* (Figura 9).

Figura 9. Alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos (ps4_seq) de *B. thuringiensis coreanensis*, obtida neste trabalho, por meio da ferramenta BLAST.



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillus thuringiensis serovar coreanensis strain ST7 plasmid pST7-3, complete sequence	Bacillus thuringiensis sero…	904	904	100%	0.0	100.00%	92610	CP016197.1
Bacillus thuringiensis strain T98 parasporin (ps4Aa) gene, partial cds	Bacillus thuringiensis	745	745	99%	0.0	93.00%	680	KC832499.1
Bacillus thuringiensis serovar shandongiensis ATGG 1470D gene for parasporin 1470D, complet…	Bacillus thuringiensis sero…	745	745	99%	0.0	93.00%	1116	AB180980.2
Bacillus thuringiensis strain T186 parasporin (ps4Aa) gene, partial cds	Bacillus thuringiensis	731	731	99%	0.0	92.40%	680	KC832500.1
Bacillus thuringiensis Cry45Aa1-like protein 3 gene, complete cds	Bacillus thuringiensis	395	450	72%	3e-105	88.10%	708	KY420192.1
Bacillus thuringiensis Cry45Aa-like protein 2 gene, complete cds	Bacillus thuringiensis	379	434	74%	3e-100	86.44%	810	KY420189.1
Bacillus thuringiensis Cry45Aa-like protein 1 gene, complete cds	Bacillus thuringiensis	338	402	74%	2e-88	83.23%	822	KY420188.1
Bacillus tropicus strain LM1212-W3 plasmid p2, complete sequence	Bacillus tropicus	186	186	61%	3e-42	73.79%	157863	CP041075.1
Bacillus thuringiensis LM1212 plasmid pLM2, complete sequence	Bacillus thuringiensis LM1…	186	186	61%	3e-42	73.79%	157839	CP024773.1
Macrobrachium nipponense isolate FS-2020 chromosome 16	Macrobrachium nipponense	56.3	56.3	8%	0.004	88.37%	92354735	CP062020.1

Resultados similares foram observados quando se utilizou a sequência deduzida de aminoácidos da ps4_seq (deste trabalho) gerada pelo aplicativo *blastx*. Esta apresentou 100% de identidade com a sequência de aminoácidos anotada como “proteína hipotética” (acesso ANN35810.1) presente no plasmídeo pST7-3 de *B. thuringiensis coreanensis* e 91% de identidade com a sequência da

proteína Parasporina PS4 de *B. thuringiensis shandongiensis*, disponível no banco de dados com número de acesso BAD22577.1 (Figura 10). Vale ressaltar que a proteína Parasporina PS4Aa1 antes era denominada Cry45Aa1 e foi reclassificada pelo *Committee of Parasporin Classification and Nomenclature* (http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/).

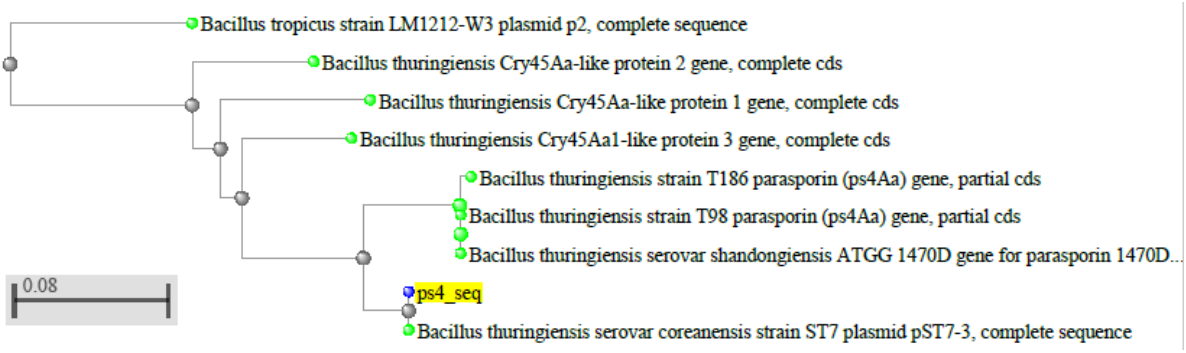
Figura 10: Alinhamento por BLAST: blastx (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) da sequência deduzida de aminoácidos da proteína PS4 de *B.t. shandongiensis* (BAD22577.1) (Query) e a proteína hipotética de *B.t. coreanensis* (ANN35810.1) (Sbjct) apresentando 91% de identidade entre elas.

```
Query  1    MAIINLANELAIWAKRWCAARGYTYLVSGLQAHTGNYGRIYNYNMSVPDPIVTDNPTNAA  60
Sbjct  1    ..................EK....ES.................I.............T.  60
Query  61   MARGTTPNPTSQPIIRTISFNETLTDSQSTATEHGITAGAEVTVKSEAGLIFAKVGFEVK  120
Sbjct  61   ........S.....V...T...........T........VSA.......FV........T  120
Query  121  VSFQYNYTTTNTYTTETSRSWTDSLQITVPPGYVTEHTFIVQTGPYSKNVVLEADIAGHG  180
Sbjct  121  ............................V.................................  180
Query  181  WFNYSAPGYTGTGIVNITQVLYDNKVPGVTPYPDNFYARFRGSGKLEGKMGLQSFVNLVE  240
Sbjct  181  ....R.....A.......R.........I.....D.......................I..  240
Query  241  RPLLGRAGQVREYQIPVSLPSGLDIPIFDPVVSLQ  275
Sbjct  241  ...S..............Q...G...........  275
```

Embora não tenhamos, ainda, o sequenciamento completo do gene *ps4* da linhagem *B. thuringiensis coreanensis* do presente estudo, a sequência parcial do mesmo permitiu a análise de identidade com as sequências do banco de dados e a observação de que o gene *ps4* encontra-se localizado em um plasmídeo, que pode até ser o pST7-3, ou muito semelhante a este. Somente o isolamento e sequenciamento completo do plasmídeo da linhagem em estudo poderia confirmar esta hipótese. No entanto, pode-se afirmar que a proteína descrita anteriormente como hipotética por ZHU (2016), codificada pela sequência de nucleotídeos presente no plasmídeo pST7-3, é uma Parasporina da família PS4. Esse resultado é contrário ao obtido por MIZUKI (2000) e ASSAEEDI & OSMAN (2017) que descrevem a amplificação de genes Parasporinas somente em DNA genômico e não em DNA plasmidial.

Com base nas distâncias genéticas inferidas pelo método *Neighbour-joining* pelo algoritmo BLAST foi possível construir uma árvore (Figura 11) a partir da qual foi possível constatar a divergência entre o gene *ps4* com outros genes semelhantes ao *cry45,* presentes também em cepas de *B. thuringiensis.* Apesar da alta identidade (93%) observada entre a sequência do gene completo (AB180980.2) com a sequência ps4_seq, obtida no presente trabalho, ambas não se encontram no mesmo nó da árvore. A sequência ps4_seq se encontra mais próxima da sequência presente no plasmídeo pST7-3 de *B. thuringiensis coreanensis*, e o gene completo *ps4* de *B. thuringiensis shandongiensis* está presente em um grupo irmão, que engloba as duas sequências parciais de *ps4* presentes no banco de dados.

Figura 11: Árvore baseada em distância inferida pelo método Neighbour-joining através da ferramenta BLAST, em que ps4_seq representa a sequência obtida no trabalho.



Ainda foi possível identificar na Figura 9 certa identidade (73%) do gene ps4_seq com um gene plasmidial da estirpe de *Bacillus tropicus* (CP041075.1), sendo este o grupo mais externo na árvore, mas, ainda assim, se apresentando como um grupo irmão da sequência obtida, dos genes *cry45* e das sequências dos genes para a proteína Parasporina PS4, podendo assim deduzir a existência de um possível ancestral comum, do gênero *Bacillus*, e de outra possível fonte de gene *ps4* em outra espécie de *Bacillus*.

6. CONCLUSÃO

Foi possível com a realização desde trabalho identificar uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* ainda não descrita no banco de dados como portadora de Parasporina PS4, que apresenta certa divergência com a sequência da Parasporina PS4 descrita por OKUMURA et al. (2006). Assim, fazendo-se uma prospecção para trabalhos futuros, seria de grande valia a realização do sequenciamento completo do gene *ps4* da linhagem em estudo, para que novas análises fossem realizadas frente a sequência *ps4Aa1* completa presente no banco de dados, para inferir corretamente se o gene encontrado se trata de uma nova subclasse dessa proteína. Posteriormente, estudos de expressão do gene *ps4* da linhagem *B. thuringiensis shandogiensis* e da linhagem *B. thuringiensis coreanensis* seriam relevantes no sentido de se comparar a ação das duas proteínas em cultivos de células cancerígenas e como possível proteína inseticida. Dessa forma, faz-se muito importante a realização deste e mais estudos para a compreensão das proteínas Parasporinas, visto que as mesmas se apresentam como uma nova alternativa promissora para o tratamento de vários tipos de câncer.

REFERÊNCIAS

ABERKANE, L. et al. In Vitro Cytotoxicity of Parasporins from Native Algerian *Bacillus thuringiensis* Strains Against Laryngeal and Alveolar Cancers. Current microbiology, v. 77, n. 3, p. 405-414, 2020.

ABOUL-SOUD, M. AM et al. 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, 2019.

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

AKIBA, T.; OKUMURA, S. Parasporins 1 and 2: their structure and activity. **Journal of invertebrate pathology**, v. 142, p. 44-49, 2017.

AKTARA, N. et al. 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, p. 82-90, 2019.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. - Rio de Janeiro: **INCA**, 2006

BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 9, p. 2793, 1997. **Câncer no Brasil: presente e futuro.** Rev. Assoc. Med. Bras. São Paulo, v. 50, n. 1, p. 1, 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302004000100001&lng=en&nrm=iso>. acesso em 21 de fevereiro de 2019.

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

CAPALBO, D. M. F.; ARANTES, O.; SUZUKI, M. T. Bacillus thuringiensis. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2005.

CHUBICKA, T. et al. 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, 2018.

CRICKMORE, N. et al. Bacillus thuringiensis toxin nomenclature. **Bacillus thuringiensis**, 2014.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Mise au point sur la classification desBacillus thuringiensis. **Entomophaga**, v. 18, n. 1, p. 5-17, 1973.

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

DE MAAGD, R. A. et al. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual review of genetics**, v. 37, 2003.

DOMÍNGUEZ-ARRIZABALAGA, M. et al. Insecticidal activity of Bacillus thuringiensis proteins against Coleopteran pests. **Toxins**, v. 12, n. 7, p. 430, 2020.

EKINO, K. et al. Cloning and characterization of a unique cytotoxic protein parasporin-5 produced by Bacillus thuringiensis A1100 strain. **Toxins**, v. 6, n. 6, p. 1882-1895, 2014.

ESTRUCH, J. J. et al. Vip3A, a novel Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FANG, J. et al. Characterization of chimeric Bacillus thuringiensis Vip3 toxins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 3, p. 956-961, 2007.

GARCÍA DÍAZ, R. Estado del arte de la actividad anticancerígena de proteínas parasporinas del Bacillus thuringiensis. **Química**, 2016.

GONZALEZ, E. et al. Parasporins from a Caribbean Island: evidence for a globally dispersed Bacillus thuringiensis strain. **Current microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1643-1648, 2011.

HALL, T. A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of Bacillus thuringiensis. Entomopathogenic bacteria: From laboratory to field application. **Springer**, Dordrecht, p. 41-64, 2000

HASTOWO, S., B. W. LAY; M. OHBA. Naturally occurring Bacillus thuringiensis in Indonesia. **Journal of applied bacteriology,** v.73, n.2, p.108-113, 1992.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Different Mechanisms of Resistance to Bacillus thuringiensis Toxins in the Indianmeal Moth. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 3, p. 1085-1089, 2001.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 53. n. 2, p. 242-255, 1989.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro, INCA 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA NACIONAL DE SAÚDE. Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 3a ed. Rio de Janeiro (Brasil): **INCA**; 1999

ITO, A. et al. A Bacillus thuringiensis crystal protein with selective cytocidal action to human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 21282-21286, 2004.

KATAYAMA, H. et al. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of Bacillus thuringiensis. **Journal of biochemistry**, v. 137, n. 1, p. 17-25, 2005.

KITADA, S. et al. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from Bacillus thuringiensis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26350-26360, 2006.

KITADA, S. et al. Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytocidal action to human hepatoma cells. **Toxicology**, v. 264, n. 1-2, p. 80-88, 2009.

LEE, D. et al. Microbial ecology of Bacillus thuringiensis: fecal populations recovered from wildlife in Korea. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 7, p. 465-471, 2003.

LERECLUS, D. Génétique et biologie moléculaire de Bacillus thuringiensis. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v. 86, n. 4, p. 337-371, 1988.

LETOWSKI, J. et al. Assessment of cry1 gene contents of Bacillus thuringiensis strains by use of DNA microarrays. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 9, p. 5391-5398, 2005.

LOGUERCIO, L. L. et al. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in Bacillus thuringiensis strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 269-277, 2002.

MAEDA, M. et al. Recovery of Bacillus thuringiensis from marine sediments of Japan. **Current microbiology**, v. 40, n. 6, p. 418-422, 2000.

MENDOZA-ALMANZA, G. et al. The cytocidal spectrum of Bacillus thuringiensis toxins: From insects to human cancer cells. **Toxins**, v. 12, n. 5, p. 301, 2020.

MIZUKI, E. et al. Unique activity associated with non-insecticidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. **Journal of applied microbiology**, v. 86, n. 3, p. 477-486, 1999.

MIZUKI, Eiichi et al. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of Bacillus thuringiensis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 4, p. 625-634, 2000.

MONNERAT, B.; KIWI-MINSKER, L.; RENKEN, A. Hydrogen production by catalytic cracking of methane over nickel gauze under periodic reactor operation. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 2, p. 633-639, 2001.

NAGAMATSU, Y. et al. Three Cry toxins in two types from Bacillus thuringiensis strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, p. 1001281837-1001281837, 2010.

OHBA, M.; AIZAWA, K. Insect toxicity of Bacillus thuringiensis isolated from soils of Japan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, n. 1, p. 12-20, 1986.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from Bacillus thuringiensis. **Anticancer Research**, v. 29, n. 1, p. 427-433, 2009.

OKASSOV, ALMAS et al. Parasporins as new natural anticancer agents: a review. **J BUON**, v. 20, n. 1, p. 5-16, 2015.

OKUMURA, S. et al. Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of Bacillus thuringiensis expressed as inclusion bodies in Escherichia coli. **Protein expression and purification**, v. 47, n. 1, p. 144-151, 2006.

OKUMURA, S.; OHBA, et al. "**Parasporin nomenclature**" (2010). Disponível em <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/> Acesso em 10 de junho de 2021

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of *B. thuringiensis* genes in crops. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.15, p.173-177, 1997.

ROGOFF, M. H.; YOUSTEN, A. A. Bacillus thuringiensis: microbiological considerations. **Annual review of microbiology**, v. 23, n. 1, p. 357-386, 1969.

SABIÁ JÚNIOR, E. F. Detecção e caracterização de proteínas parasporinas em Bacillus thuringiensis. 2015.

SAITOH, H. et al. Investigation of a novel Bacillus thuringiensis gene encoding a parasporal protein, parasporin-4, that preferentially kills human leukemic T cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 12, p. 2935-2941, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning-Sambrook & Russel-Vol. 1, 2, 3. **Cold Springs Harbour Laboratory Press**, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of Bacillus thuringiensis-based insecticides. **Journal of invertebrate pathology**, v. 77, n. 1, p. 13-21, 2001.

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

TEIXAIRA, L. A.; PORTO, M. A.; NORONHA, C. P. **O câncer no Brasil: passado e presente**. Outras Letras, 2012.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994. UICC. **Câncer today**. Disponível em <https://www.uicc.org/resources/cancer-today-info> acesso em 25 de agosto de 2019.

TYAGI, A.; KAPOOR, P. et al. (2013). In silico models for designing and discovering novel anticancer peptides. **Scientific Reports**, 3(1), 2984.

VELASQUEZ, L. F.; DAN'ITHZA, S. R. T.; CERÓN, J. A. Proteínas de Bacillus thuringiensis con actividad citotóxica: Parasporinas. Revista Colombiana de Biotecnología, v. 20, n. 2, p. 89-100, 2018.

WEI, J. et al. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2760-2765, 2003.

XU, C., et al. "Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins." *Toxins* 6.9 (2014): 2732-2770.

YAMASHITA, S. et al. Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytocidal activity on limited human cancer cells. **Journal of biochemistry**, v. 138, n. 6, p. 663-672, 2005.

YU, C. et al. The Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.