

**Natacha Sofia Rodrigues Raimundo**

**Pesquisa de Proteínas Citotóxicas e Nematicidas em  
isolados *Bacillus thuringiensis* dos Açores**



**Universidade dos Açores**

**Departamento de Biologia**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, sob  
orientação da Professora Doutora Carla Manuela Machado Mendes Leite Cabral e  
do Doutor Duarte Nuno Tiago Toubarro**

**Ponta Delgada**

**2015**



## Índice

Agradecimentos	Pág. 5
Resumo	Pág. 6
Introdução	Pág. 10
<i>Bacillus thuringiensis</i> nos Açores	Pág. 11
$\delta$ -endotoxinas	Pág. 12
Proteínas Cyt	Pág.13
Proteínas Cry	Pág.15
Parasporinas	Pág.16
Aplicações e Futuro	Pág.19
Importância para a saúde	Pág.20
Objetivos	Pág.20
Material e Métodos	Pág.22
Cultivo e selecção dos isolados	Pág.22
Observação dos Isolados em Microscopia Óptica de Contraste de Fase	Pág.22
Extração de DNA	Pág.23
Análise de Restrição do gene 16S	Pág.23
Pesquisa de genes das Parasporinas	Pág.24
Pesquisa de genes <i>cyt</i>	Pág.27
Pesquisa de genes <i>cry</i> nematicidas	Pág.28
Purificação DNA e Sequenciação	Pág.29
Produção, Extração e Solubilização de cristais a partir da cultura	Pág.29
Cromatografia de Exclusão Molecular	Pág.30

SDS-PAGE	Pág.30
Teste de Atividade para pesquisa de atividade nematicida	Pág.32
Resultados	Pág.36
Observação dos Isolados em Microscopia Óptica de Contraste de Fase	Pág.36
Análise de Restrição do gene 16S	Pág.36
Pesquisa de Genes codificantes de Parasporinas	Pág.39
Pesquisa de Genes codificantes <i>cyt</i>	Pág.41
Pesquisa de Genes codificantes <i>cry</i> Nematicidas	Pág.42
Sequenciação	Pág.43
Tratamento das Sequências	Pág.44
Solubilização das Proteínas	Pág.46
Teste de Atividade para pesquisa de atividade nematicida	Pág.52
Discussão	Pág.56
Observação dos Isolados em Microscopia Óptica de Contraste de Fase	Pág.56
Análise de Restrição do gene 16S	Pág.56
Pesquisa de genes das Parasporinas	Pág.57
Pesquisa de genes <i>cyt</i>	Pág.58
Pesquisa de genes <i>cry</i> nematicidas	Pág.60
Solubilização, Cromatografia de Exclusão Molecular e SDS-PAGE	Pág.60
Teste de Atividade para pesquisa de atividade nematicida	Pág.61
Considerações Finais	Pág.63
Bibliografia	Pág.64
Anexos	Pág.69

## Agradecimentos

Após a finalização deste trabalho, quero deixar o meu agradecimento a todas as pessoas que apoiaram e contribuíram, de uma forma directa ou indirecta, para a realização deste trabalho, pois sem eles nada disto seria possível.

À professora Doutora Carla Mendes Cabral, minha orientadora neste longo trabalho de pesquisa e de dissertação, deixo o meu sincero agradecimento por todo o conhecimento transmitido e pelo tempo disponibilizado ao longo deste ano de trabalho, auxiliando desde o trabalho laboratorial como na escrita da dissertação. Obrigada pelas suas palavras de apoio e motivação demonstradas no desenvolvimento deste trabalho. A sua orientação foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Duarte Toubarro agradeço o interesse demonstrado pelo meu trabalho e pelo apoio nas tarefas relacionados com a caracterização da proteína.

Ao Dr. Mário Teixeira agradeço a informação prestada sobre a classificação de Bt's, bem como pela disponibilização de documentação. Ao Sr. Pedro agradeço o seu apoio, estando sempre disponível para ajudar. Agradeço, ainda, os conhecimentos transmitidos nas práticas com nematodes, nomeadamente na recuperação de hemolinfa de *Galleria mellonella*.

À Dr<sup>a</sup> e amiga Caterina Gulamo agradeço o apoio durante a realização das tarefas, pela companhia e pelas palavras de apoio ao longo da realização deste mestrado. Deixo também uma palavra de agradecimento aos restantes colegas e amigos de Licenciatura e de Mestrado pelo interesse demonstrado.

Um enorme agradecimento, num contexto mais pessoal, quero deixar à minha família, mãe, pai e irmãos, sem dúvida são os meus pilares e sem eles nada disso seria possível. Obrigado por acreditarem em mim, apoiando-me sempre em todas as situações. Obrigada!

## Resumo

*Bacillus thuringiensis* (Bt), pertencente à família *Bacillaceae*, é classificado como gram-positiva e tem despertado elevado interesse em várias áreas, destacando-se a aplicações na agricultura e na saúde. Os isolados de Bt são caracterizados pela sua capacidade de produzir inclusões cristalinas de origem proteica durante a fase de esporulação, as quais são conhecidas como proteínas  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas pesticidas. Estas são constituídas pelas toxinas Cyt e Cry que apresentam actividade extremamente específica contra insectos, nematodes e determinadas linhagens celulares cancerígenas. Nesta tese, foram seleccionados 89 isolados de *Bacillus thuringiensis* pertencentes à colecção de entomopatógenos do Departamento de Biologia da Universidade dos Açores com o objetivo que realizar um *screening* para a identificação de genes codificantes para proteínas citotóxicas e nematicidas, nomeadamente parasporinas, Cyt e Cry nematicidas. Foi feito um *screening* utilizando *primers* para zonas conservadas *forward* e *reverse ps1, ps2, ps3, ps4, ps5* e *ps6* na pesquisa de genes codificantes para parasporinas e *gral\_cyt, cyt2* e *gral\_nem* para a identificação de genes codificantes para proteínas Cyt e Cry Nematicidas, respetivamente. De acordo com os resultados, neste grupo de isolados de Bt dos Açores, não foram identificados genes codificantes para parasporinas. Na pesquisa de genes codificantes para Cyt e Cry nematicidas, alguns isolados apresentaram produtos de amplificação os quais foram sequenciados. Após o tratamento das sequências obtidas e análise em blastn, verificou-se a presença de genes *cyt1* e *cyt2* no isolado S133 B que apresenta um cristal com morfologia esférica. Ambos os fragmentos de 500pb obtidos apresentaram entre os 100 e os 98% de identidade para genes *cyt1* e de 99% para genes *cyt2*. No isolado L8D foi identificado um fragmento de 500bp com 75% identidade com um gene *cry21* nematicida. Visto que o valor de identidade é relativamente baixo, podemos estar na presença de uma nova subfamília de Cry21, de acordo com as regras do sistema de nomenclatura de toxinas de Bt. Os cristais produzidos por ambos os isolados foram extraídos a fim de avançar na sua caracterização. Estes foram solubilizados em tampão de solubilização (50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 10mM DTT) em vários períodos de incubação, sendo que a quantificação de proteína demonstrou ser mais elevada após 16 horas de incubação em ambos os isolados. As amostras foram submetidas a electroforese em SDS-PAGE de modo a obter o perfil proteico. O perfil obtido para S133 B apresentou

bandas mais intensas com aproximadamente 25KDa e com cerca de 70 KDa, valor esperado para proteínas Cyt que, de acordo com a bibliografia, apresentam cerca de 25 a 28 KDa. Para as proteínas solubilizadas de L8D não foi possível identificar as bandas devido à baixa quantidade de proteína obtida nas amostras. No entanto, ao analisar o perfil da amostra de cristais não solubilizados de L8D, temos uma banda mais intensa entre 135 e os 180 KDa, valores semelhantes aos descritos para Cry nematicida. A actividade nematicida foi testada num ensaio contra estados infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora*. No ensaio foram utilizados dois meios de cultura, FLA e Meio Fígado, bioconvertidos pela bactéria simbiote do nematode. Ao meio de cultura foram adicionados cristais não solubilizados do isolado L8D em diferentes quantidades: 10µl, 20µl e 30µl. Foram também preparados poços com 30 µl de cristais de S133 B e poços de controlo, onde não foi aplicado nenhum tratamento. Os resultados demonstraram mortalidade apenas nos poços de tratamento com cristais de L8D, atingindo 72% de mortalidade, sendo esta mortalidade dose-dependente. Não se verificou mortalidade nem nos poços de controlo, nem nos poços de tratamento com cristais de S133 B. De acordo com a pesquisa realizada, temos genes que codificam proteínas citotóxicas Cyt1 e Cyt2, ambas referidas na bibliografia pela sua capacidade de matar células cancerígenas. Os resultados do ensaio com cristais de L8D sobre *H. bacteriophora*, mostram que o fragmento do gene sequenciado, apresenta homologia com o gene *cry21*, codifica uma proteína com actividade nematicida. Uma vez que esta proteína pode ser eficaz no tratamento de infecções provocadas por parasitas em humanos, é fundamental avançar na sua caracterização e purificação, sendo necessário perceber se estamos na presença de uma nova subfamília de Cry21, e testar a sua actividade com a realização de bioensaios sobre nematodes parasitas de humanos.

## Abstract

*Bacillus thuringiensis* (Bt), belongs to the Bacillaceae family, is a gram-positive and has been a subject of great interest in many areas, especially for applications in agriculture and health. The Bt strains are characterized by the production of crystalline inclusions of protein origin during sporulation, which are known as  $\delta$ -endotoxins or pesticide proteins. These crystals include Cry and Cyt toxins which present extremely specific activity against insects, nematodes and certain cancer cell lines. In this dissertation, 89 strains of *Bacillus thuringiensis* from the Azorean entomopathogenic collection of the University of the Azores, were selected in order to carry out a screening for genes encoding for cytotoxic and nematicidal proteins, particularly parasporin, Cyt and Cry. The screening was made using primers forward and reverse for conserved regions ps1, ps2, ps3, ps4, ps5 and ps6 in search for genes coding parasporin and *gral\_cyt*, *cyt2* and *gral\_nem* for identifying genes coding for Cyt and Cry nematicidal proteins, respectively. According to the results, this group of Azorean strains there were no identified genes coding for parasporin. In the search of genes coding for Cyt and Cry nematicides, some strains showed amplification products which were sequenced. After treatment of the obtained sequences and analysis in blastn, we verified the presence of genes *cyt1* and *cyt2* on strain S133 B. The crystals of this strain show spherical morphology. Both fragments of 500bp present between 100 and 98% identity to *cyt1* genes and 99% to *cyt2* genes. In L8D strain a fragment of 500bp was identified that shows 75% identity with a nematicide cry21 gene. Since the identity value is relatively low, we can be in presence of a new subfamily of Cry21, according to the rules of Bt toxins nomenclature system. The crystals produced by both strains were extracted in order to advance in their characterization. They were solubilized with solubilization buffer (50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 10mM DTT) at various periods of incubation and the protein quantification proved to be higher after 16 hours of incubation in both strains. The samples were subjected to SDS-PAGE to obtain a protein profile. The profile obtained in S133 B samples showed more intense bands of approximately 25KDa and about 70KDa, expected value for Cyt proteins, according to literature, has about 25 to 28 KDa. For the L8D solubilized proteins it wasn't possible to identify the bands due to the low amount of protein in the samples. However, when analyzing the

profile of non-solubilized crystals of L8D, there is a more intense band between 135 to 180KDa, as those described for Cry nematicide. The nematicide activity was tested in a trial against infectious states of *Heterorhabditis bacteriophora*. In the test we used two culture media, FLA and liver bioconverted by symbiont bacteria of the nematode. In the culture medium was added non solubilized crystals of L8D strain in various quantities: 10µl, 20µl and 30µl. As controls, wells with 30µl of crystals of S133 B and control wells where no treatment was applied were also prepared. The results showed mortality only in wells treat with L8D crystals, reaching 72% mortality, in a dose-dependent mortality. There wasn't mortality in the control wells or in wells treated with S133 B crystals. In this work, we identified coding genes to cytotoxic proteins Cyt1 and Cyt2, both referred in literature for its ability to kill cancer cells. The test results for L8D in *H. bacteriophora*, show that the sequenced gene fragment, has homology with a *cry21* gene, encodes a protein with nematicidal activity. Since this protein as the potential to be used in treating caused by parasites in human infections, it is important to advance in his characterization and purification, being necessary to understand if we are in the presence of a new subfamily of Cry21, and test the activity by performing bioassays on nematodes parasites of humans.

## Introdução

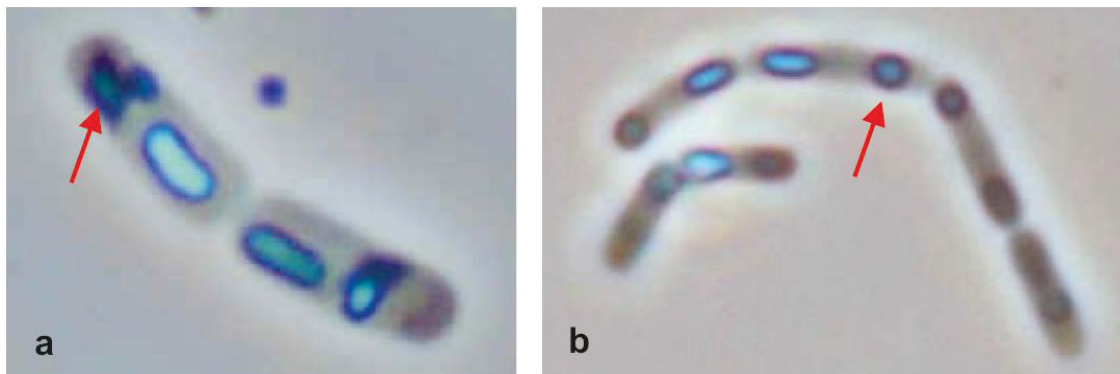
*Bacillus thuringiensis* (Bt), pertencente à família *Bacillaceae*, é classificado como gram-positiva e tem despertado elevado interesse em várias áreas, destacando-se a aplicações na agricultura e na saúde (Okassov *et al.*; 2014; Roh *et al.*; 2007). Pertence ao grupo *Bacillus cereus* que inclui as espécies *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* (Xu *et al.*; 2014). *B. thuringiensis* pode ser encontrado em vários ambientes, tendo sido isolado a partir de solo, poeiras, insectos e folhas de várias zonas do mundo (Roh *et al.*; 2007).

As estirpes de *Bacillus thuringiensis* apresentam uma grande variedade de factores de virulência que contribuem para o seu efeito patogénico como exotoxinas e proteases extracelulares, sendo, no entanto, as proteínas pesticidas são as que têm despertado elevado interesse (Iatsenko *et al.*; 2014). Os isolados de Bt são caracterizados pela sua capacidade de produzir inclusões cristalinas de origem proteica durante a fase de esporulação, sendo esta a característica de distinção entre *B. thuringiensis* e as restantes espécies do grupo *B. cereus*, que se encontram próximas a nível taxonómico (Ohba *et al.*; 2009; Lenina *et al.*; 2013; Xu *et al.*; 2014). Estas inclusões são compostas por proteínas conhecidas como proteínas  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas pesticidas, constituídas pelas toxinas Cyt e Cry, as quais apresentam actividade extremamente específica contra insectos, nematodes e ainda determinadas linhagens celulares (Iatsenko *et al.*; 2014; Saitho *et al.*; 2006; Ohba *et al.*; 2009). A sua elevada toxicidade em insectos e nematodes, faz com que sejam utilizados no controlo de pragas agrícolas e no controlo de insetos que atuam como vectores em algumas doenças, como por exemplo malária e dengue, sendo assim considerados importantes para a gestão da saúde pública (Ohba *et al.*, 2009; Lenina *et al.*, 2014; Iatsenko *et al.*; 2014). Apresentam-se ainda como uma alternativa aos insecticidas químicos (Ito *et al.*, 2004; Jisha *et al.*; 2013).

## ***Bacillus thuringiensis* nos Açores**

Nos Açores existe uma grande diversidade genética de *Bacillus thuringiensis*, sendo que a grande maioria dos isolados apresentam atividade inseticida, pelo que têm sido amplamente estudados com grande potencial no controlo biológico de pragas (Teixeira *et al.*; 2014 submetido). Várias expedições foram realizadas em diferentes ilhas do arquipélago de modo a recolher isolados a partir do solo com o objetivo de procurar novos isolados produtores de citotoxinas (Teixeira *et al.*; 2011). As inclusões cristalinas destes isolados podem ser classificadas morfológicamente como sendo amorfas, associadas ao esporo, esféricas ou bipiramidais, estando os últimos dois tipos de morfologia referidos representados na figura 1 (Ohba *et al.*; 2009). Pensa-se que a morfologia amorfa destas inclusões pode estar relacionada com a presença de proteínas citotóxicas, nomeadamente as parasporinas (Teixeira *et al.*; 2011).

**Fig. 1:** Cristais bipiramidais de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (a) e cristais esféricos da bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* (b) (Teixeira *et al.*; 2011).



Estudos realizados no Japão, Vietnam, Índia e Canadá com isolados de Bt semelhantes morfológicamente aos Bt's dos Açores, têm demonstrado a presença de proteínas citotóxicas com resultados promissores na terapêutica do cancro (Gonzalez *et al.*; 2011). Além disso estudos anteriormente realizados com Bt's dos Açores sugerem que há isolados com características específicas, o que eleva o interesse na pesquisa de proteínas com as referidas características nos isolados Açorianos (Montiel *et al.*; 2005; Santiago-Alvarez, *et al.*, 1998). No entanto, desde 1996 têm sido desenvolvidos estudos com o objetivo de procurar proteínas dos cristais com atividade citotóxica,

nomeadamente com acção sobre determinadas células cancerígenas humanas (Lenina *et al.*; 2014).

Os isolados de Bt recolhidos nas várias ilhas dos Açores têm demonstrado ser ativos contra insectos que são considerados importantes pragas no arquipélago (Montiel *et al.*; 2005). Além disso, estes patógenos também são utilizados como modelos de investigação quer nos estudos de diversidade genética nas ilhas, quer na pesquisa de mecanismos de patogenicidade com a identificação, purificação e caracterização das moléculas bioactivas, muitas delas com grande potencial em saúde, como por exemplo uma serino-protease com actividade fibrinolítica que se encontra em testes para avaliar a sua viabilidade no tratamento de coágulos no sangue, que estão na origem da maioria das doenças cardiovasculares (Montiel *et al.*; 2005).

### **$\delta$ -endotoxinas**

Atualmente são conhecidas duas classes de  $\delta$ -endotoxinas (delta-endotoxinas) produzidas por Bt durante a fase de esporulação, temos as toxinas parasporais designadas por proteínas cristalinas (Cry) e proteínas citolíticas (Cyt) (Bravo *et al.*; 2007; Guerchicoff *et al.*; 2001). Este tipo de toxinas apresentam toxicidade para determinados insectos, bem como para outros organismos como nematodes, protozoários e ácaros, mas são inócuos para seres vertebrados (Gonçalves *et al.*; 2014; Bravo *et al.*; 2007). De modo geral, as  $\delta$ -endotoxinas constituintes dos cristais são protoxinas solubilizadas e proteoliticamente convertidas em polipeptídeos menores no trato digestivo dos insetos susceptíveis (Bobrowski *et al.*; 2003). Estes polipeptídeos ligam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino dos insetos, causando lise osmótica por meio da formação de poros na membrana (Bobrowski *et al.*; 2003). Ou seja, estes cristais ao serem ingeridos pelo inseto são ativadas no seu intestino onde encontram o pH alcalino fundamental solubilização dos cristais e passagem de protoxinas a proteínas ativas, por meio de clivagens proteolíticas que removem as regiões N- e C- terminais. Ao ligarem-se aos receptores, formam poros nas membranas das células epiteliais intestinais, provocando desequilíbrio osmótico e lise celular, culminando na morte do inseto (Xu *et al.*; 2014; Bravo *et al.*; 2007).

As toxinas Cry e Cyt pertencem a uma classe de toxinas bacterianas conhecidas como toxinas formadoras de poros (PFT, do inglês *pore-forming toxins*) que são segregadas como proteínas solúveis em água que sofrem alterações conformais de modo a inserir ou translocar através de membranas celulares no hospedeiro (Bravo *et al.*; 2007). Existem dois grupos principais de PFT um é caracterizado pela formação de poros transmembranares e o outro dá-se pela inserção de toxinas  $\beta$ -barrel na membrana (Bravo *et al.*; 2007). De modo geral, as bactérias formadoras de PFT secretam as suas toxinas e estas interagem com os receptores específicos localizados na superfície da célula hospedeira. Geralmente as PFT são activadas por proteases do hospedeiro após a ligação ao receptor induzindo a formação de uma estrutura oligomérica. Finalmente, a inserção na membrana é desencadeada, na maioria dos casos, por uma diminuição do pH que induz a oligomerização e formação do poro (Bravo *et al.*; 2007).

Os genes codificantes para estas toxinas encontram-se localizados em plasmídeos, pelo que apresentam elevada variabilidade entre estirpes de Bt resultando numa elevada variabilidade de proteínas cristalinas (Mendoza *et al.*; 2012). Mais de 100 genes codificantes para proteínas Cry foram identificados, sendo considerados uma família com elevada diversidade por atuarem em insectos, nematodes e protozoários (Guerchicoff *et al.*; 2001).

## **Proteínas Cyt**

As proteínas Cyt, constituem um grupo menor de proteínas cristalinas com atividade inseticida, sendo reconhecida a sua acção principalmente sobre Dípteros como mosquitos e moscas negras (Palma *et al.*; 2014). Estas são codificadas por genes com a mesma designação (*cyt*), são citotoxinas isoladas de *B. thuringiensis* produzidas na fase de esporulação. Estas são caracterizadas por, contrariamente às proteínas Cry, não se ligarem a receptores específicos, interagindo directamente com a membrana fosfolipídica, formando poros (Bravo *et al.*; 2007; Xu *et al.*; 2014). O comité de classificação de toxinas de *B. thuringiensis* classificou este grupo de toxinas em três

famílias distintas, Cyt1 (subfamílias: 1Aa, 1Ab, 1Ac e 1Ad), Cyt2 (subfamílias: 2Aa, 2Ba, 2Bb, 2Bc, e 2Ca) e Cyt3 (Aa1), sendo organizadas de acordo com as sequências de aminoácidos (Bravo *et al.*; 2007; Palma *et al.*; 2014; Xu *et al.*; 2014). Estudos têm mostrado que estas proteínas atuam de forma sinérgica com proteínas Cry, isto é, a ação de Cyt potencia a ação de proteínas Cry (Bravo *et al.*; 2007; Palma *et al.*; 2014). Pensa-se que tal ocorre pois aquando a ligação das proteínas Cyt à membrana das células epiteliais do intestino dos insectos, estas deixam expostas os locais de reconhecimento das proteínas Cry, facilitando a oligomerização destas resultando na formação de poros na membrana (Bravo *et al.*; 2007). As protoxinas Cyt são activadas pela clivagem dos grupos terminais N- e T-, passando desse modo à sua forma ativa (Bravo *et al.*; 2007).

A proteína Cyt1Aa é a mais conhecida e foi a primeira a ser identificada e caracterizada. Desde então outras têm sido identificadas sendo classificadas como pertencentes ao mesmo grupo, caracterizados por apresentarem cerca de 28KDa, podendo ser activada por proteases que originam um fragmento com cerca de 25KDa (Guerchicoff *et al.*; 2001; Soberón *et al.*; 2012). No intestino do insecto a activação da proteína é mediada pela acção da tripsina onde é formada uma toxina ativa com cerca de 249 aminoácidos (Guerchicoff *et al.*; 2001). A atividade citolítica desta proteína é atribuída à hidrofobicidade e à capacidade de se ligar aos fosfolípidos (Bravo *et al.*; 2007). Cyt1Aa é considerada a mais ativa em células de várias origens (Cohen *et al.*; 2007). Trabalhos realizados *in vivo* concluíram que esta proteína, por agir como proteína membrana, pode alargar o espectro de mecanismos celulares que podem ser afectados por fármacos anti-cancerígenos (Cohen *et al.*; 2007). Foi ainda identificado um segundo gene *cyt* em *B. thuringiensis* subespécie *israelensis*, chamado *cyt2Ba1* com cerca de 27 a 28KDa (Guerchicoff *et al.*; 2001).

Como as proteínas Cyt são conhecidas pela sua atividade tóxica sobre Dípteros, nomeadamente mosquitos, tornam-se proteínas de interesse no combate a importantes vectores de doenças humanas, tais como malária, febre-amarela, dengue e filariose linfática que causam milhões de mortes em todo o mundo (Soberón *et al.*; 2012; Okassov *et al.*; 2015). Também tem sido reportado que Cyt2C apresenta atividade sobre nematodes, nomeadamente *Rhabditida*, bem como sobre células cancerígenas (Palma *et al.*; 2014). Para além da atividade inseticida, estas proteínas demonstraram atividade *in*

*in vitro* sobre diferentes células em cultura e têm capacidade de provocar a hemólise em eritrócitos (Soberón *et al.*; 2012).

## **Proteínas Cry**

Produzidas durante a fase de esporulação, tal como as restantes inclusões de origem proteica de Bt, as proteínas Cry apresentam toxicidade em diferentes ordens de insectos, nomeadamente Lepidópteros, Dípteros, Coleóptera (Iatsenko *et al.*; 2014; Jisha *et al.*; 2013). São ainda conhecidas, embora em menor número, proteínas Cry com atividade sobre nematodes (Hu *et al.*; 2012). Têm despertado interesse de vários grupos de investigação, visto que não apresentam toxicidade para os vertebrados (Iatsenko *et al.*; 2014). De acordo com Bravo *et al.*; 2011, já foram descritas cerca de 500 sequências de genes *cry* e as suas proteínas foram organizadas em 67 grupos (Cry1-Cry67) de acordo com a sequência de aminoácidos. Estas apresentam pesos entre 50 e os 140 KDa (Roh *et al.*; 2007). Após a sua ingestão pelos insectos, as protoxinas são solubilizadas e digeridas proteoliticamente formando os fragmentos tóxicos (Roh *et al.*; 2007). Com a activação através das clivagens das regiões terminais N- e C- dá-se a formação da toxina activa com cerca de 60 e 70 KDa (Roh *et al.*; 2007).

Quanto ao seu modo de acção, o modelo geralmente aceite, mostra que a toxina activa liga-se aos receptores localizados na membrana das microvilosidades apicais de epiteliais células intestinais (Roh *et al.*; 2007). Após essa ligação, pensa-se que há uma alteração na conformação da molécula que permite a inserção da toxina na membrana, que promove a formação do poro na membrana que provoca o desequilíbrio osmótico, culminando na lise da célula (Roh *et al.*; 2007).

Estas proteínas têm sido amplamente estudadas e aplicadas como controlo biológico de pragas agrícolas (Jouzani *et al.*; 2008). Estes podem substituir os pesticidas químicos os quais têm provocado efeitos severos ao ambiente, nomeadamente ao nível da poluição, que por sua vez provoca efeitos devastadores na saúde humana, como cancro e desordens do sistema imunológico (Bravo *et al.*; 2011).

Para além da sua aplicação no controlo biológico, estas proteínas podem ser aplicadas na saúde humana sendo aplicado no tratamento de infecções de determinados parasitas de humanos, como *Ascaris lumbricoides* (Hu *et al.*; 2012). Nos dias de hoje,

ainda são muitos os casos de infecções provocadas por parasitas, principalmente nos países em desenvolvimento, que provocam malnutrição, anorexia, atraso no crescimento, atraso cognitivo e ainda alterações no sistema imunológico (Hu *et al.*; 2012; Okassov *et al.*; 2015). Vários estudos têm sido realizados apresentando resultado promissores para o tratamento destas infecções, utilizando como modelos nematodes como *Pristionchus pacificus* e *Caenorhabditis elegans* (Hu *et al.*; 2012; Iatsenko *et al.*; 2014). A atividade nematicida tem sido encontrada em vários Cry como por exemplo Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21 e Cry55 (Zhang *et al.*; 2012).

Para além destas proteínas Cry, há um grupo de proteínas Cry que não apresentam atividade inseticida, nem nematicida, mas apresentam atividade citolítica contra células cancerígenas humanas, sendo conhecidas como Parasporinas (Palma *et al.*; 2014).

## **Parasporinas**

O conceito de parasporinas (PS) foi definido em 2006, pelo Comité de Classificação e Nomenclatura de Parasporinas, como “*B. thuringiensis* e proteínas bacterianas parasporais relacionados, que são não-hemolíticas, mas são capazes de matar, preferencialmente, células cancerígenas humanas”, ou seja, são proteínas produzidas naturalmente por *B. thuringiensis*, com alvos específicos em células cancerígenas, sendo capazes de induzir a morte celular (Xu *et al.*, 2014). Além do seu potencial anticancerígeno, estas proteínas despertam interesse devido à diversidade do seu modo de ação e à sua elevada especificidade. Atualmente este grupo de proteínas é classificado em seis famílias com espectros de atividade citotóxica diferencial: PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 e PS6, sendo que ainda pouco se sabe sobre as últimas duas famílias (Ohba *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014; Lenina *et al.*, 2014; Palma *et al.*; 2014). As famílias de parasporinas são classificadas em dois tipos com base no seu peso molecular (Ekino *et al.*; 2014). O grupo que apresenta menor massa molecular inclui PS1, PS3 e PS6, enquanto que as restantes (PS2, PS4 e PS5) pertencem ao grupo que apresenta menor massa molecular (Ekino *et al.*; 2014). As proteínas do primeiro grupo expressam proteínas precursoras de 80KDa, as quais são processadas em formas ativas com 60KDa. São ainda caracterizadas por apresentarem estrutura de três domínios (Ekino *et al.*;

2014). Já as proteínas do segundo grupo (menor massa molecular) apresentam formas ativas com 30KDa que são processadas proteoliticamente a partir de precursores com 33 a 37KDa. Apresentam uma estrutura três-domínios, mas sem regiões conservadas como as do grupo anterior (Ekino *et al.*; 2014). Segundo Ohba *et al.*, 2009, já foram isoladas 13 proteínas de 11 estirpes de *B. thuringiensis* (Ohba *et al.*, 2009).

As parasporinas da família PS1, codificada pelo gene *cry31Aa1* com 2169 pb de comprimento, são polipéptidos de 723 aminoácidos com 81.045 Da. Esta proteína caracteriza-se por possuir uma estrutura do tipo três domínios, típica de outras proteínas Cry, cuja sequência de aminoácidos contém cinco regiões conservadas (Xu *et al.*, 2014; Ohba *et al.*, 2009). Após digestão proteolítica, a qual ocorre na região N-terminal da proteína precursora de 81 KDa, dá-se a formação de dois fragmentos com 15 e 56 KDa os quais associam-se e formam um complexo ativo, tóxico para determinadas células cancerígenas (Ohba *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014). A família parasporinas PS2, cujo gene é *cry46Aa1* com 1014 pb, codifica um polipéptido de 338 aminoácidos com cerca de 37.446 Da (Ohba *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014). O processamento proteolítico da proteína precursora de 37 KDa origina uma citotoxina de 30 KDa ativa em células cancerígenas, sendo que a digestão ocorre nas regiões N- e C-terminais (Ohba *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014). Ao contrário das parasporinas tipo PS1, as parasporinas da família PS2 não apresentam os três domínios com as cinco regiões conservadas (Xu *et al.*, 2014; Ohba *et al.*, 2009). Já as parasporinas da família PS3, são codificadas pelo gene *cry41Aa1*, sendo constituídas por 825 aminoácidos com 93.689 Da (Xu *et al.*, 2014; Ohba *et al.*, 2009). A digestão proteolítica da proteína precursora de 81 KDa, origina um fragmento tóxico de 64 KDa, pelo processamento proteolítico nas regiões N- e C-terminais, mesmo apresentando os três domínios com as regiões conservadas como as PS1 (Xu *et al.*, 2014; Ohba *et al.*, 2009). As parasporinas do tipo PS4, codificadas pelo gene *cry45Aa1* com 828 pb, compreendem 275 aminoácidos e um peso molecular estimado de 30.078 Da (Ohba *et al.*, 2009). As parasporinas da família PS5 são codificadas pelo gene *cry64Aa1*, foi isolada por Ekino e Shin em 2009 (Okassov *et al.*; 2015). Apresenta uma proteína precursora de 30KDa e está a ser utilizada em estudos de citotoxicidade em células de várias origens de mamíferos (Ekino *et al.*, 2014). Já as parasporinas PS6, descritas como toxina CP84 e codificadas pelo gene *cry63Aa*, são processadas a partir de uma proteína precursora de 84KDa para formar uma proteína madura de 73KDa (Ekino *et al.*, 2014; Okassov *et al.*; 2015).

Vários têm sido os estudos que demonstram atividade citotóxica destas proteínas através de ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares cancerígenas (Okumura *et al.*, 2004; Saitho *et al.*, 2006; Ohba *et al.*, 2009). Num dos ensaios foram testadas 13 linhagens humanas de tecidos de várias origens, das quais nove amostras de células cancerígenas, quatro amostras normais, isto é, não amostras de tecidos não-cancerígenos, e ainda cinco amostras de tecidos não humanos (duas de macaco e três de roedores) (Ohba *et al.*, 2009). Nestes trabalhos, verificou-se que de modo geral, as famílias de parasporinas testadas apresentam atividade citotóxica sobre células cancerígenas humanas (tabela 1) (Okumura *et al.*, 2004; Ohba *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014). De acordo com um estudo realizado por Saitho *et al.* em 2006, proteínas pertencente a PS4 revelaram ser altamente tóxicas para células T leucémicas (MOLT-4) após 1h da administração, mas não tóxicas para células do cancro do colo do útero (HELA) exibindo assim atividade citotóxica preferencial e rápida (Saitho *et al.*, 2006). Resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade demonstram a elevada especificidade da atividade das várias famílias de Parasporinas (Okumura *et al.*, 2004; Saitho *et al.*, 2006; Ohba *et al.*, 2009).

**Tabela 1)** Resultados de ensaios de citotoxicidade, de várias linhagens celulares tratadas com parasporinas PS1-PS4, realizados em estudos anteriores (Ohba *et al.*, 2009).

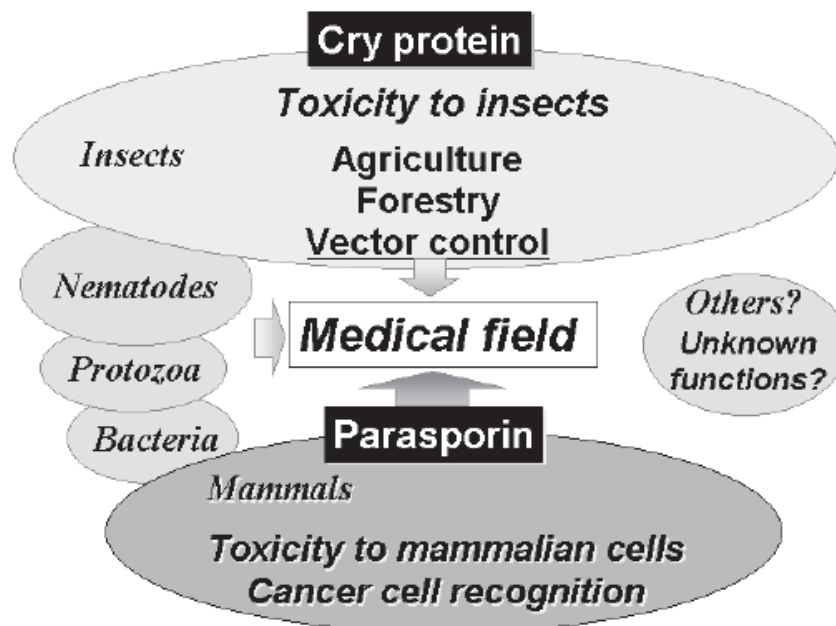
Cell line	Origin	Cytotoxicity <sup>a</sup>			
		PS1Aa1	PS2Aa1	PS3Aa1	PS4Aa1
<b>Human</b>					
HeLa	Uterine cervical cancer	+++	-	-	-
Sawano	Endometrial adenocarcinoma	-	++++	-	+++
TCS	Uterine cervical cancer	- <sup>b</sup>	-	-	+++
UtSMC	Normal uterine smooth muscle	-	++	-	-
MOLT-4	Acute lymphoblastic leukemia	++	++++	-	+++
HL-60	Promyelocytic leukemia	+++	++++	++	+++
Jurkat	T-cell leukemia	-	++++	-	-
T-cell	Normal T lymphocyte	-	+++	-	-
HepG2	Hepatocellular carcinoma	++	++++	++	++
HC	Normal hepatocyte	-	-	-	-
A549	Lung adenocarcinoma	-	+++	-	-
MRC5	Normal fetal lung fibroblast	-	+	-	-
Caco-2	Colorectal carcinoma	-	+	-	+++
<b>Monkey</b>					
Vero	Kidney (African green monkey)	-	NT	-	-
COS-7	Kidney (African green monkey), SV-40 transformed	-	NT	-	-
<b>Rodent</b>					
PC12	Pheochromocytoma (rat)	NT	NT	NT	++
NIH3T3	Embryo (mouse)	-	NT	-	-
CHO	Ovary (Chinese hamster)	NT	NT	NT	-

<sup>a</sup>References: Katayama *et al.* (29), Ito *et al.* (23), Kitada *et al.* (37), Yamashita *et al.* (24), and Okumura *et al.* (35). The levels of cytotoxicity, based on the EC<sub>50</sub> values in cell proliferation assay (46), were graded as follows: extremely high (++++), high (+++), moderate (++), low (+), and very low / non-toxic (-). NT: Not tested. <sup>b</sup>Mizuki *et al.* (unpublished observation).

## Aplicações e Futuro

Atualmente a maior aplicação das toxinas inseticidas é no campo do controle biológico de pragas agrícolas, no entanto, as toxinas de Bt têm vindo a ganhar relevo no controle de vectores para a prevenção de epidemias de doenças mediadas por insectos, tais como a malária, a dengue e a cegueira do rio Africano (Kitada *et al.*; 2005; Okassov *et al.*; 2015). Recentemente, foram relatadas estirpes de Bt com ação contra parasitas protozoários como *Trichomonas vaginalis*, que afetam 170 milhões de pessoas a nível mundial. As proteínas Cry também têm sido abordadas pela sua atividade sobre nematodes, o que sugere que podem ser usadas no futuro no combate de infecções provocadas por nematodes (Kitada *et al.*; 2005; Okassov *et al.*; 2015). Nos últimos anos foi descoberto que algumas destas toxinas são capazes de matar células cancerígenas, as quais têm sido caracterizadas a nível molecular (Kitada *et al.*; 2005). Embora nos dias de hoje a pesquisa sobre parasporinas ainda seja conduzida em vários laboratórios, no futuro próximo, espera-se que estas toxinas possam atrair uma série de cientistas e que a sua aplicação juntamente com proteínas Cry e outras toxinas Bt irá continuar a contribuir para o campo da saúde (Kitada *et al.*; 2005).

**Fig. 2:** Toxinas Cry e parasporinas de Bt e suas aplicações no futuro (Kitada *et al.*; 2005).



## **Importância para a saúde**

Nos últimos anos o cancro tem sido descrito como uma das doenças de maior causa de mortalidade em todo o mundo. Como tal tem levado ao desenvolvimento de vários estudos com objetivo de conhecer algum método de tratamento e/ou prevenção, sendo que algumas das estratégias passam pela mortalidade das células cancerígenas (Okassov *et al.*; 2015). As toxinas Cyt e parasporinas aparecem como toxinas promissoras nesta área, sendo capazes de provocar lise em linhagens celulares cancerígenas de várias origens não apresentando toxicidade para os humanos (Ohba *et al.*; 2009; Okassov *et al.*; 2015). Desse modo, podem ser consideradas uma esperança na terapêutica do cancro, podendo representar uma alternativa aos atuais tratamentos realizados como quimioterapia e radioterapia que provocam efeitos prejudiciais à saúde do doente (Ohba *et al.*; 2009; Okassov *et al.*; 2015).

Quanto às proteínas Cry, apesar da sua aplicação e abordagem com potencial de agente de controlo biológico, estas têm-se destacado também pela capacidade nematicida/helminte, sendo capaz de provocar mortalidade em várias espécies que tem como hospedeiro o humano (Hu *et al.*; 2012; Iatsenko *et al.*; 2014). Nos países em desenvolvimento há ainda um elevado número de indivíduos afectados por parasitas, principalmente crianças e grávidas, resultando em elevados casos de mortalidade (Hu *et al.*; 2012). Ora as toxinas Cry nematicidas surgem como promissoras no tratamento desse tipo de infecções, sendo capaz de baixar a mortalidade e melhorar as condições de vida da população afectada (Hu *et al.*; 2012). Além dessa atividade, temos de abordar a sua acção como bioinsecticida substituindo os químicos existentes actualmente (Bravo *et al.*; 2011). Com a utilização de proteínas Cry como bioinsecticidas haverá uma diminuição da poluição melhorando os indicadores de saúde pública em todo o mundo (Bravo *et al.*; 2011). A utilização destas toxinas pode ainda contribuir para a diminuição dos casos de doenças transmitidas por vectores, visto que actualmente os mosquitos desenvolveram resistência à maioria dos insecticidas químicos (Ibarra *et al.*; 2003).

## **Objetivo**

Com base no potencial citotóxico das moléculas produzidas por *B. thuringiensis*, as quais podem vir a ser aplicadas na terapêutica do cancro, contra infecções nematicidas, como biopesticidas e ainda como contra vectores de doenças, torna-se

necessário caracterizar estas proteínas e conhecer o seu modo de acção. Sabemos que apesar de atuarem de diversos modos, são moléculas com elevada especificidade (Ohba *et al.*, 2009). Desse modo, no âmbito da tese para a obtenção do grau mestre em Ciências Biomédicas, realizou-se um screening de proteínas com atividade citotóxica e nematicida de isolados de *Bacillus thuringiensis* dos Açores através de uma abordagem genética. Para tal, pretende-se:

- ✓ Proceder ao screening para a pesquisa de genes codificantes para proteínas citotóxicas (parasporinas e Cyt) e para proteínas Cry nematicidas, utilizando *primers* para as zonas conservadas dos genes codificantes e que se encontram descritos na bibliografia;
- ✓ Identificar os isolados positivos;
- ✓ Cultivar os isolados seleccionados e obter os cristais proteicos;
- ✓ Caracterizar parcialmente as proteínas do cristal nos isolados seleccionados;
- ✓ Testar a actividade das proteínas do cristal dos isolados seleccionados.

## **Material e Métodos**

### **Cultivo e selecção dos isolados**

No presente estudo foram utilizados 89 isolados de *Bacillus thuringiensis* pertencentes à colecção de entomopatógenos do Departamento de Biologia da Universidade dos Açores, sendo caracterizados pela presença de cristais com morfologia esférica, amorfa, associado ao esporo e bipiramidais com inclusões. Os isolados provêm de várias ilhas do arquipélago, apresentando-se no anexo I a lista de isolados utilizados e a respectiva informação sobre a ilha onde foram colhidos. A colecção encontra-se mantida em tiras de papel de filtro desidratadas impregnadas com esporos de cada isolado, estando conservadas a 10°C. Os isolados foram recuperados colocando uma fita de papel de filtro numa placa de agar nutritivo (20gr de agar nutritivo; 1000ml de H<sub>2</sub>O destilada) realizando um riscado a partir das fitas de papel de filtro. Após 24h de incubação a 28°C, retirou-se uma colónia de cada isolado realizando-se uma nova cultura em placas de agar T<sub>3</sub> (para 1l de meio: 5g de peptona, 1,5g de extracto de levedura, 15,0g de agar, 0,002g de MnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 0,02g MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 1,4g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1000ml de água destilada) meio este que favorece a esporulação devido à sua baixa composição em nutrientes e foram incubadas a 28°C durante 42h. As culturas foram mantidas a 4°C e repicadas mensalmente.

### **Observação dos Isolados em Microscopia Óptica de Contraste de Fase**

Retirou-se uma amostra de uma colónia de cada isolado para uma lâmina e observou-se em microscópio óptico de contraste de fase a presença e a morfologia do cristal, de modo a confirmar as informações previamente registadas na base de dados. Os resultados observados foram registados e os isolados que não apresentaram cristal foram excluídos do estudo.

### **Extração de DNA**

Cada isolado foi inoculado em caldo nutritivo (13gr de caldo nutritivo; 1000ml de H<sub>2</sub>O destilada) de modo a obter cultura para a extração de DNA. Após 18h de incubação a 28°C a 200 rpm, retirou-se 1ml de cada cultura para um eppendorff de 1.5ml esterilizado. Esta foi a centrifugar durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. De seguida, adicionou-se 500µl de água MilliQ esterilizada, agitou-se no vortéx e centrifugou-se durante 3 minutos nas mesmas condições. Verteu-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µl de água MilliQ esterilizada colocando-se a -80°C durante 15 minutos. De seguida, os eppendorffs foram colocados no termobloco a 95°C durante 15 minutos, esta variação de temperatura permite a lise das células e obtenção do DNA total. Centrifugou-se durante 3 minutos e retirou-se o sobrenadante, o qual contém o DNA total, para um novo eppendorff esterilizado. O DNA foi quantificado no Thermo Scientific NanoDrop 2000c Spectrophotometer e foi mantido a -20°C.

### **Análise de Restrição do gene 16S**

Para alguns isolados realizou-se a análise de restrição do gene 16S utilizando-se o método de Wu *et al.*; 2006 com a amplificação de parte do gene para RNAr16S. Os *primers* utilizados foram: B-K1F (5' TCA CCA AGG CRA CGA TGC G 3') e B-K1R (5'CGT ATT CAC CGC GGC ATG 3') a 25mM. Foi realizado a mistura para a reacção de PCR (Polymerase Chain Reaction) composta por 20,4µl de H<sub>2</sub>O MilliQ esterilizada, 2,5 µl de 10X Dream Taq Green Buffer da Thermo Scientific, 0,5 µl de dNTP's 10mM, 0,25 µl de cada primer e 0,1 µl de Dream Taq DNA Polymerase 5U/ µl, 500U (composição para 24 µl de mix). Dessa mistura distribui-se 24 µl em cada eppendorff e adicionou-se 1 µl de DNA do isolado a analisar. As amostras foram colocadas no termociclador nas seguintes condições: passo inicial de desnaturação durante 3 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 30 segundos a 63°C e 2 minutos a 72°C, com um passo de extensão final a 72°C durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2%. De seguida, preparou-se a restrição com a enzima *AluI* preparando-se a mistura com a seguinte composição: 8,5 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ esterilizada, 1 µl de 10X Dream Taq Green Buffer da Thermo Scientific e 0,5 µl da enzima de restrição *AluI* da FastDigest. Desta mistura colocou-se 15µl em

cada eppendorff e adicionou-se 5 µl do produto de PCR. Estes foram incubados a 37°C durante 15 minutos e de seguida a 65°C durante 5 minutos. Os resultados foram visualizados em gel de agarose a 2%, com brometo de etídio incorporado, o qual correu em TBE (Tris/Borato/EDTA) 0.5X a 80V durante 45 minutos. Como controlo positivo foi utilizado o isolado *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). O marcador utilizado nas corridas foi 100pb Ladder da BioRon. Os resultados foram visualizados recorrendo ao Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ with Image lab software da BioRad e comparados com os perfis descritos para *Bacillus thuringiensis* em Wu *et al.*; 2006.

### **Pesquisa de genes das Parasporinas**

O DNA de cada isolado foi organizado em grupos de cinco designados por pool. A organização de isolados por pool foi realizada aleatoriamente de modo a que cada pool fosse composto por valores semelhantes de DNA dos isolados. Esta organização em grupos de 5 isolados foi produzida de modo a obter 1000ng de DNA de cada isolado por pool, perfazendo-se o restante volume com água MilliQ esterilizada (tabela 2).

**Tabela 2:** Composição de pools de DNA com cinco isolados cada, para pesquisa de genes. Na presente tabela temos a quantidade de DNA de cada isolado colocado no pool identificado, bem como a quantidade de água MilliQ esterilizada adicionada a cada pool perfazendo 100µl de amostra.

Pool 1		Pool 2		Pool 3		Pool 4		Pool 5		Pool 6		Pool 7	
DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado
1,8	S68C	1,9	S175D	2,1	CR1e	2,2	S170B	2,2	CR7d	2,3	S162E	2,3	S167A
15,4	S215a	13,6	S75D	12,5	Bti 14T	10,5	S165B	9,8	CR24b	9,7	S78E2	8,1	FL4EB1
3,1	S63C	3	S180A-Gut	3	S104C2	2,9	S45B	2,9	S164B	2,8	S44D	2,8	S176E
3,5	S162D	3,6	S1A	3,1	S36D	3,1	S198d	3,1	CR10d	3,5	S99B	3,1	S78D
5	181B-Hemo	5,3	CR24D	5	S133B	4	CR23c	4,4	CR18c	4	S29E	5,4	FL7DC
71,2		72,6		74,3		77,3		77,6		77,7		78,3	
Pool 8		Pool 9		Pool 10		Pool 11		Pool 12		Pool 13		Pool 14	
DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado	DNA (µl)	Isolado
2,3	S27D	2,4	S85E	2,4	S171D	2,4	S77A	2,5	S104D2	2,5	S47D	2,5	S130A
7,8	S195b	7,4	S45D	7,3	S216b	7,2	S196a	6,6	FL4EC1	7	S27B	6,5	S166E
2,8	S42D	2,6	S7A	2,6	S176C	2,6	S175B	2,6	S36B	3	S45E	2,5	S30E
3,1	L8D	3,3	S29C	3,4	S94E1	3,3	FL1CB	3,8	S35E	4	CR18b	4	S103B
5	S102C2	5,9	S69E	5,4	S28B	6,3	S98E	4	S108B2	4	FL4EB11	4,4	S163E
79		78,4		78,9		78,2		80,5		79,5		80,1	
H <sub>2</sub> O (µl)		72,6		74,3		77,3		77,6		77,7		78,3	
H <sub>2</sub> O (µl)		78,4		78,9		78,2		80,5		79,5		80,1	

Após a organização das amostras em grupos de cinco, foram realizados PCR's com os *primers* para a amplificação de genes das parasporinas *ps1*, *ps2*, *ps3*, *ps4*, *ps5* e *ps6*. As reacções de PCR foram realizadas no termociclador c1000 da BioRad sendo que as condições seguidas nas reacções para amplificação de parasporinas foram: uma desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de desnaturação durante 1 minuto a 95°C, temperatura de annealing de acordo com o *primer* utilizado durante 1 minuto (tabela 3), extensão a 72°C durante 1 minuto e um passo de extensão final a 72°C de 5 minutos.

**Tabela 3.:** *Primers* utilizados, temperaturas de annealing aplicadas nas reacções para amplificação dos genes das parasporinas e tamanho do produto de amplificação esperado. Nas reacções na análise de *ps1* e *ps5* a temperatura variou entre os valores referidos de modo a otimizar a amplificação (\*). Informação baseada em Espino-Vázquez, A. *et al*; 2012.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	T annealing (°C)	Tamanho (pb)
<i>ps1</i>	F TACAAGCAGGGCGTCCAG R TCTGCTGGAATTTGCAATGCT	53 a 57°C (*)	737
<i>ps2</i>	F TGTTGGGACTGTTTCAGTACG R GTAGTAGAGAATGAACTTCTCCACC	54°C	237
<i>ps3</i>	F TGGGCGAATACTGACGTCCT R GCAGTGCTTGTACCCGCTAC	54°C	1057-1069
<i>ps4</i>	F GACAGAAACGTCTCGGAGTT R TACCAGTGTAACCAGGAGCA	53,5°C	172
<i>ps5</i>	F CGGAGACAACAACAACAACAAATG R CCAGCATAACCTGGTAAAGGCG	53,5 a 55°C (*)	414
<i>ps6</i>	F TACAAGCGAGTTAGCATC R GATAAAGTTCAACGGTTCCAGC	48,5°C	647

O mix para a reacção de PCR foi preparado para um volume total de 23µl por reacção (19,4 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ esterilizada, 2,5µl de 10X Dream Taq Green Buffer da Thermo Scientific, 0,5 µl de dNTPs 10mM, 0,25 µl de cada *primer* (forward e reverse) 25mM e 0,1 µl de Dream Taq DNA Polymerase 5U/ µl, 500U perfazendo-se a reacção final de 25µl com 2µl de DNA a analisar.

Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose a 1.5% com TBE 0.5X e com brometo de etídio incorporado, a 100V durante 35 minutos. O marcador utilizado em todas as corridas foi 100pb Ladder da BioRon. Os resultados foram visualizados recorrendo ao Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ with Image lab software da BioRad. Este procedimento foi realizado para as amostras de DNA organizadas por pool e repetido para os isolados dos pool onde houve amplificação de produtos de PCR, de modo a detectar qual o isolado positivo.

### Pesquisa de genes *cyt*

Utilizando os pools de DNA preparados anteriormente, foram realizadas reacções de PCR para a identificação de genes *cyt1* e *cyt2*. Para tal preparou-se a mistura para a reacção de PCR com a seguinte composição: 19,4 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ esterilizada, 2,5µl de 10X Dream Taq Green Buffer da Thermo Scientific, 0,5 µl de dNTPs 10mM, 0,25 µl de cada *primer* (forward e reverse) a 25mM e 0,1 µl de Dream Taq DNA Polymerase 5U/ µl, 500U perfazendo-se a reacção final de 25µl com 2µl de DNA.

As condições da reacção de PCR utilizadas no termociclador c1000 da BioRad foram 2 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto à temperatura de annealing referida na tabela 4 e 1 minuto de extensão a 72°C, terminando com um passo de extensão final de 5 minutos a 72°C.

**Tabela 4.:** *Primers* *gral\_cyt* e *cyt2* utilizados, sequências, temperaturas de annealing aplicadas nas reacções para amplificação de genes *cyt1* e *cyt2* e tamanho de produto de amplificação esperado. Informação baseada em Bravo *et al.*; 1998<sup>(1)</sup> e em Vidal-Quist *et al.*; 2008<sup>(2)</sup>.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	T annealing (°C)	Tamanho (pb)	Gene Detetados
gral-cyt <sup>(1)</sup>	F AACCCCTCAATCAACAGCAAGG	51	522	<i>cyt1Aa</i>
	R GGTACACAATAACATAACGCCACC		525	<i>cyt1Ab</i>
cyt2 <sup>(2)</sup>	F AATACATTTCAAGGAGCTA R TTTCATTTTAACTTCATATC	42	469	<i>cyt2</i>

Os resultados foram visualizados em gel de agarose a 1.5% o qual correu em TBE 0.5X a 100V, durante 35 minutos. O marcador utilizado foi 100pb Ladder da BioRon e como controlo positivo utilizou-se o isolado *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Os resultados foram visualizados recorrendo ao Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ with Image lab software da BioRad. Este procedimento foi realizado para as amostras de DNA organizadas por pool e repetido para os isolados dos pool onde houve amplificação de produtos de PCR, de modo a detectar qual o isolado positivo.

### Pesquisa de genes *cry* nematicidas

Para a identificação de genes *cry* nematicidas aplicamos 2µl DNA dos pool referidos anteriormente na seguinte reacção de PCR composta por: 19,4 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ esterilizada, 2,5µl de 10X Dream Taq Green Buffer da Thermo Scientific, 0,5 µl de dNTPs 10mM, 0,25 µl de cada *primer* (*foward* e *reverse*, referidos na tabela 5) a 25mM e 0,1 µl de Dream Taq DNA Polymerase 5U/ µl, 500U. As referidas reacções foram colocadas no termociclador c1000 da BioRad nas seguintes condições: desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto à temperatura de annealing de 50°C e 1 minuto de extensão a 72°C, terminando com um passo de extensão final de 5 minutos a 72°C.

**Tabela 5.:** *Primers* utilizados na identificação de genes *cry* nematicidas, sequências, temperatura de annealing aplicada nas reacções para amplificação e tamanho do produto de amplificação esperado para os possiveis genes detetados. Informação baseada Vidal-Quist *et al*; 2008.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	T annealing (°C)	Tamanho (pb)	Genes Detetados
gral_nem	F TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAA R AAGACCAAATTCAATACCGGGTT	50	474	<i>cry5</i>
			477	<i>cry12</i>
			483	<i>cry14</i>
			489	<i>cry21</i>

Os produtos de PCR foram visualizados nas mesmas condições usadas para a identificação de genes *cyt*. O marcador utilizado foi 100pb Ladder da BioRon. Os

resultados foram visualizados recorrendo ao Molecular Imager Gel Doc™ XR+ with Image lab software da BioRad. Este procedimento foi realizado para as amostras de DNA organizadas por pool e repetido para os isolados dos pool onde houve amplificação de produtos de PCR, de modo a detectar qual o isolado positivo.

### **Purificação DNA e Sequenciação**

Face à amplificação de DNA para os genes de parasporinas, *cyt* e *cry* nematicidas, os produtos de PCR foram purificados utilizando Kits de purificação. No caso dos isolados que produziram apenas um produto de PCR foi utilizado o PureLink PCR Purification Kit. Já para os isolados em que se obteve mais do que um produto de PCR, excisamos a banda com a dimensão de interesse e aplicamos em colunas do Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System da Promega. Em ambas as situações foram seguidos os protocolos associados aos kit's, sendo que o DNA das amostras foi quantificado e enviado para sequenciação pela STAB VIDA com os respectivos *primers* forward e reverse.

Após a obtenção das sequências das amostras enviadas, estas foram editadas no BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5 obtendo-se a sequência consenso. Com esta sequência consenso procuramos as homologias com as sequências disponíveis na base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) recorrendo à ferramenta blastn.

### **Produção, Extração e Solubilização de cristais a partir da cultura**

Preparou-se o pré-inóculo a partir de uma colónia dos isolados S133 B e L8D num tubo de 5ml de meio T<sub>3</sub> (para 1l de meio: 5g de peptona, 1,5g de extracto de levedura, 15,0g de agar, 0,002g de MnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 0,02g MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 1,4g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1000ml de água destilada) e foram incubados a 30°C durante 24h a 200rpm. Retirou-se 2ml do pré-inóculo e inoculou-se em 150ml de meio T<sub>3</sub> e foi a incubar a 30°C durante 72h a 200rpm. Centrifugou-se a cultura durante 12 minutos a 7900rpm a 4°C utilizando a centrífuga Sigma 3-16 KL. Descartou-se o sobrenadante e procedeu-se a duas lavagens do pellet com NaCl-T 1M (1M NaCl; 0.1% Triton X 100)

centrifugando a 4°C a 8000rpm durante 10 minutos. Após as lavagens com NaCl-T 1M realizou-se quatro lavagens com água destilada gelada centrifugando-se nas mesmas condições das lavagens anteriores. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o pellet em 5ml de água destilada que foi distribuído por vários eppendorffs esterilizados resultando alíquotas de 1ml cada. Estas foram armazenadas a -20°C para posteriores utilizações.

Para a solubilização dos cristais, descongelou-se as alíquotas necessárias e centrifugou-se a 13000rpm durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e colocou-se 750µl de tampão de solubilização (50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 10mM DTT) de acordo com Lenina *et al.*; 2014. Para otimizar as condições de solubilização da proteína, foram testados diferentes períodos de incubação: 0h, 1h, 2h, 4h, 6h e 16h. Para tal, o pellet foi ressuspendido no tampão e deixou-se as amostras em agitação durante os tempos referidos. Após a solubilização, centrifugou-se a 13000rpm durante 15 minutos e retirou-se o sobrenadante para um novo eppendorf, quantificando-se de seguida a proteína da amostra utilizando o Thermo Scientific NanoDrop 2000c Spectrophotometer escolhendo a opção Protein A280.

### **Cromatografia de Exclusão Molecular**

De modo a fraccionar as proteínas, 500µl da amostra de cristais solubilizados de L8D foram aplicados numa coluna Superdex 200 de cromatografia gel filtration num sistema de Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC da GE Healthcare Life Sciences), que permitiu o fraccionamento da nossa amostra de acordo com o seu tamanho molecular. O tampão utilizado no procedimento foi PO<sub>4</sub> pH 7.5 50 mM 1.15M NaCl. As fracções resultantes foram concentradas em centricon de cutoff de 10.000KDa com o mesmo tampão da cromatografia a 5500rpm, durante 15 minutos a 4°C.

### **SDS-PAGE**

Para a visualização do perfil proteico das amostras não solubilizadas, bem como das amostras do teste de solubilização e das fracções resultantes da cromatografia

anteriormente realizada fez-se uma separação das proteínas por SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Para tal, foram realizados géis de separação a 12% (3,4ml H<sub>2</sub>O MiliQ; 4,0ml 30% Acrilamida/Bis; 2,5ml de Tris-HCl pH 8.8; 0,1ml 10% SDS) e géis de concentração a 7% (3,4ml H<sub>2</sub>O MiliQ; 4,0ml 30% Acrilamida/Bis; 2,5ml de Tris-HCl pH 6.8; 0,1ml 10% SDS). Aos 10ml resultante do gel de separação adicionou-se 75µl de 10% APS e 30µl de TEMED e a 1ml de gel de concentração adicionou-se 30µl de 10% APS e 15µl de TEMED. As amostras foram preparadas de acordo com o indicado nas tabelas 6, 7 e 8 para um volume máximo de 20 a 25µl por poço, de modo a perfazer 60ng de proteína em cada poço, não sendo possível para todas as amostras, devido à quantidade de proteína de algumas amostras ser baixa.

**Tabela 6:** Composição das amostras aplicadas nos poços do SDS-PAGE das amostras de S133B nos vários tempos de solubilização.

	0h	1h	2h	4h	6h	16h
Tampão da Amostra	4µl	4µl	4µl	4µl	4µl	4µl
Tris-HCl 1M pH 6.8	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	5,02µl
Amostra	14µl	14µl	14µl	14µl	14µl	10,98µl
Volume final (µl)	20	20	20	20	20	20

**Tabela 7:** Composição das amostras aplicadas nos poços do SDS-PAGE das amostras de L8D nos vários tempos de solubilização. Amostra L8D representa a amostra de cristais não solubilizados.

	L8D	0h	1h	2h	4h	6h	16h
Tampão da Amostra	4µl	4µl	4µl	4µl	4µl	4µl	4µl
Tris-HCl 1M pH 6.8	11µl	1µl	1µl	6µl	1µl	6µl	1µl
Amostra	10µl	20µl	20µl	15µl	20µl	15µl	20µl
Volume final (µl)	25	25	25	25	25	25	25

**Tabela 8:** Composição das amostras aplicadas nos poços do SDS-PAGE das fracções da cromatografia de exclusão molecular. Amostra L8D representa a amostra inicial injectada na coluna de cromatografia de onde resultaram as fracções.

	L8D	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Tampão da Amostra	4µl	4µl	4µl	4µl	4µl	4µl	4µl
Tris-HCl 1M pH 6.8	8µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
Amostra	12µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
Volume final (µl)	25	25	25	25	25	25	25

As amostras foram incubadas a 95°C durante 10 minutos e posteriormente inseridas nos respectivos poços do gel. Os géis correram em tampão de corrida pH 8.3, a uma amperagem constante de 25 Volts e com uma voltagem até 150 Volts durante cerca de 90 minutos utilizando o Power Pac 300 da BioRad. Foi utilizado 4µl do marcador Nzytech – Protein Marker II 100 lines. Os géis foram corados com azul coomassi sob agitação e de seguida descorados com água destilada.

### **Teste de Atividade para pesquisa de atividade nematicida**

Para a realização de ensaios de actividade, testamos diferentes quantidades de cristais sobre o nematode *Heterorhabditis bacteriophora* no estado de IJ (juvenil infectante) que se encontrava armazenado em câmara a 10°C. Foi retirado 1ml da suspensão que continha IJ's de *H. bacteriophora* os quais foram centrifugados e tratados com solução de Javel (diluição 1:10 de lixívia comercial ¼ em água destilada) durante 15 minutos de modo a remover a cutícula. A suspensão que continha os nematodes foi centrifugada a 2000rpm durante 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e realizou-se três lavagens com 1ml de soro fisiológico esterilizado (4.5g de NaCl para 500ml de água destilada), removendo sempre o sobrenadante. Após as lavagens, ressusendeu-se os nematodes em 1ml de soro fisiológico esterilizado.

O primeiro ensaio foi realizado em meio sólido com fortified lipid agar (FLA) (1.6% caldo nutritivo; 1.2% agar bacteriológico; 1% de óleo de milho) em placas de petri de vidro esterilizadas. Preparou-se o pré-inoculo do isolado AZ144 de *Photorhabdus luminescens* em TSB+YE (3% triptona soja; 0.5% extracto de levedura) e incubou-se a 28°C durante 24h a 200rpm. Inoculou-se 100µl do pré-inoculo nas placas de agar FLA espalhando gotas por toda a placa de modo uniforme e incubou-se a 28°C durante 24 horas. Aplicaram-se diferentes quantidades de cristais ressuspendidos em água destilada de ambos os isolados, sendo testados 20µl, 50 µl e 100µl do isolado L8D e 100µl de cristais do isolado S133B. Foram adicionados em cada placa 10µl de soro fisiológico com cerca de 10 nematodes previamente lavados em solução de Javel. As placas armazenadas foram armazenadas a 23°C e visualizadas com lupa passadas 24h e 48h. Os resultados foram registados.

Os ensaios em meio líquido foram realizados em placas de 96 poços esterilizadas sendo utilizados dois meios: meio fortified lipid (1.6% caldo nutritivo; 1% óleo de milho) e meio fígado (para 1l: 100gr de porco; 10gr de extracto de levedura; 1ml de óleo de milho). O isolado AZ144 de *Photorhabdus luminescens* foi inoculado em ambos os meios, sendo incubados a 28°C durante 24 horas. Foram ainda inoculados os isolados S133B e L8D em ambos os meios nas mesmas condições que *Photorhabdus luminescens*, os quais foram usados no ensaio de modo a testar o comportamento dos nematodes com a bactéria na forma vegetativa. Preparou-se dois conjuntos de ensaios, um com 5µl de meio e outro com 10µl. Após a aplicação dos meios na placa, foram aplicados os cristais de acordo com o descrito na tabela 9. Preparou-se um grupo de controlo onde não se aplicou cristais. Para cada situação, foram preparadas 3 repetições.

**Tabela 9:** Esquema do ensaio em meio líquido FLA e de Fígado em placa de 96 poços com os vários tratamentos aplicados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Meio FLA Controlo			Meio Fígado Controlo			FLA + S133B			Fígado + S133B		
B	FLA + L8D			Fígado + L8D			FLA + 10µL Cristais L8D			Fígado + 10µL Cristais L8D		5µL DE Meio com Photo
C	FLA + 20µL Cristais L8D			Fígado + 20µL Cristais L8D			FLA + 30µL Cristais L8D			Fígado + 30µL Cristais L8D		
D	FLA + 30µL Cristais S133B			Fígado + 30µL Cristais S133B			Isolado S133B			Isolado L8D		
E	Meio FLA Controlo			Meio Fígado Controlo			FLA + S133B			Fígado + S133B		
F	FLA + L8D			Fígado + L8D			FLA + 10µL Cristais L8D			Fígado + 10µL Cristais L8D		10µL DE Meio com Photo
G	FLA + 20µL Cristais L8D			Fígado + 20µL Cristais L8D			FLA + 30µL Cristais L8D			Fígado + 30µL Cristais L8D		
H	FLA + 30µL Cristais S133B			Fígado + 30µL Cristais S133B			Isolado S133B			Isolado L8D		

Na placa de 96 poços foram adicionados 5 e 10 µl de cada meio (tabela 9), bem como 10µl de soro fisiológico com cerca de 20 a 30 IJ's de *H. bacteriophora* em cada um dos poços. Os primeiros poços de controlo eram compostos apenas com 5µl de cada meio com *Photorhabdus luminescens*, 10µl de soro com 20 a 30 de IJ's e perfez-se o volume com soro fisiológico até 75µl. Nos seguintes poços, o meio FLA e fígado com *P. luminescens* foram substituídos pelos meios inoculados com os isolados S133B e L8D de modo a testar o comportamento dos IJ's face à presença dos isolados de Bt em multiplicação. Nos restantes adicionamos meio FLA e fígado com *P. luminescens* e tratamento com cristais de L8D em quantidades distintas: 10, 20 e 30µl, respectivamente. Foram ainda preparados poços com 30µl de cristais do isolado S133B em ambos os meios. Todas as situações descritas foram repetidas na mesma placa com 10µl de meio em vez de 5 µl aplicados nos primeiros 42 poços. Foram realizadas três repetições para cada situação. Perfez-se o volume com soro fisiológico até 75 µl. Os IJ's foram observados diariamente, durante 6 dias, registando-se o número de nematodes mortos e a modificação na mobilidade.

Foi realizado ainda um ensaio com a proteína solubilizada e concentrada por passagem em centricon com cutoff de 10.000KDa em tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.5 ( $\text{PO}_4$  pH 7.5 50mM; 1.15M NaCl). Neste ensaio foi utilizado nos poços de controlo 24 $\mu\text{l}$  de solução de tyrode (para 1l: 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 0.2 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 g de  $\text{MgCl}_2$ , 0.05 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 1 g de D-glucose) esterilizada por filtração em membrana 0,22 $\mu\text{m}$ , com 2% de hemolinfa, obtida de *Galleria mellonella* previamente colocadas num banho a 60°C durante 5 minutos. Esse procedimento foi repetido por 10 poços, sendo o volume total de cada poço de 25 $\mu\text{l}$ . Nos 20 poços seguintes, aplicamos aos 18,77 $\mu\text{l}$  de solução de tyrode com 2% de hemolinfa, 5,23 $\mu\text{l}$  de proteína solubilizada do isolado S133B nos primeiros 10 poços e um tratamento com 60 $\mu\text{g/ml}$  (5,23  $\mu\text{l}$ ) de proteína solubilizada do isolado L8D nos últimos 10 poços. Foi adicionado 1 $\mu\text{l}$  com apenas um IJ em cada poço.

As placas foram armazenadas a 23°C durante o decorrer dos ensaios. Os resultados foram visualizados diariamente até 6 dias, utilizando a lupa. Os resultados foram registados.

## Resultados

### Observação dos Isolados em Microscopia Óptica de Contraste de Fase

A observação microscópica de isolados da colecção de *B. thuringiensis* do Departamento de Biologia permitiu uma análise quanto à presença ou ausência de cristal, bem como quanto à classificação de acordo com a sua morfologia, sendo os resultados apresentados na tabela 10. Na tabela do anexo I temos a identificação de todos os isolados analisados, bem como as observações quanto à presença ou ausência de cristal, informações sobre a morfologia do cristal e da ilha de colheita do isolado. Verificou-se que 8 isolados não apresentavam cristal em todas as células. Ainda, 6 isolados não apresentaram cristal, pelo que foram excluídos.

**Tabela 10.:** Observações obtidas na análise em microscopia óptica de contraste de fase, correspondendo a cada morfologia o número de isolados observados com a referida característica.

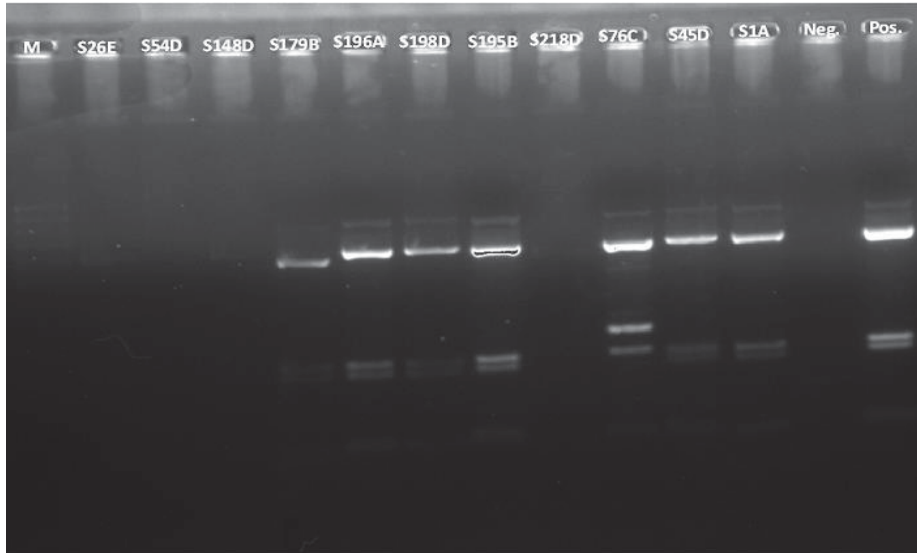
Morfologia do Cristal	Nº de Isolados
Esférico	51
Amorfo	19
Associado ao esporo	6
Bipiramidais com inclusão	6

### Análise de Restrição do gene 16S

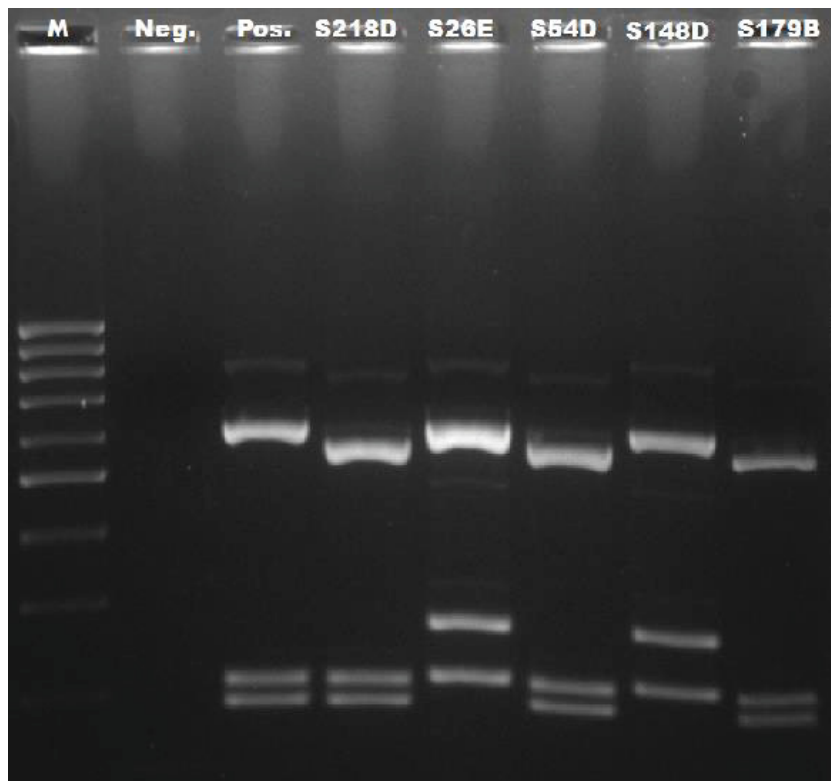
Na realização da restrição do gene 16S com a enzima *AluI* para os isolados que não apresentaram cristal em todas as células e para os isolados que aquando a sua observação microscópica suscitaram dúvidas na classificação como *Bacillus thuringiensis*, foram obtidos os perfis que seguem nas figuras 2, 3 e 4. Na análise dos perfis e comparando com o obtido pelo controlo positivo (Bti), temos que os isolados S76 C, S103D-G, S149 B, S150 E, S168 A, S218 E, S225 D, S218 D, S26 E, S54 D,

S148 D e S179 B apresentaram perfis diferentes do esperado para *Bacillus thuringiensis*.

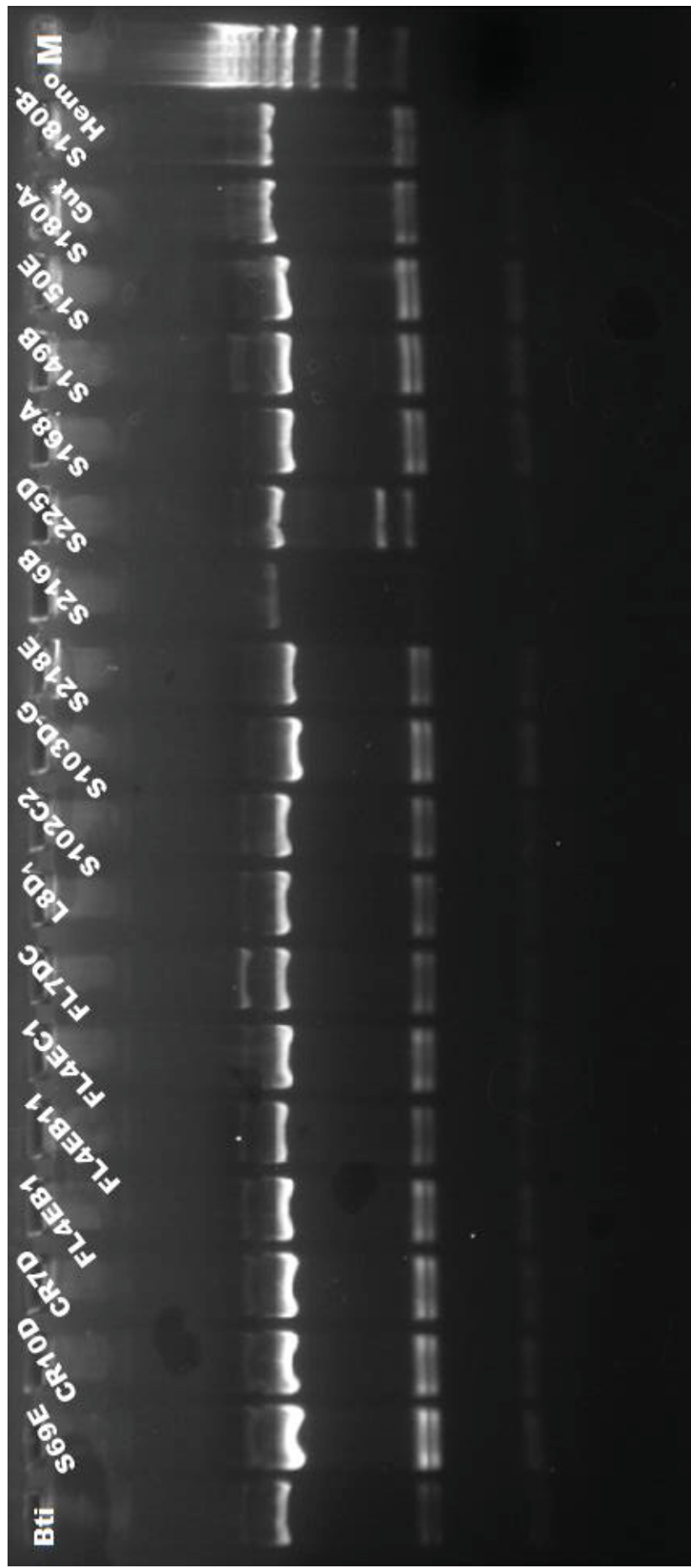
**Fig. 2:** Resultado dos perfis de restrição do gene 16S, obtidos por digestão com *AluI* em gel de agarose a 2%, para os isolados identificados. Legenda: M, marcador 100pb DNA Ladder; Neg., Controlo negativo; Pos., controlo positivo.



**Fig. 3:** Resultado dos perfis de restrição do gene 16S, obtidos por digestão com *AluI* em gel de agarose a 2%, para os isolados identificados. Legenda: M, marcador 100pb DNA Ladder; Neg., Controlo negativo; Pos., controlo positivo.



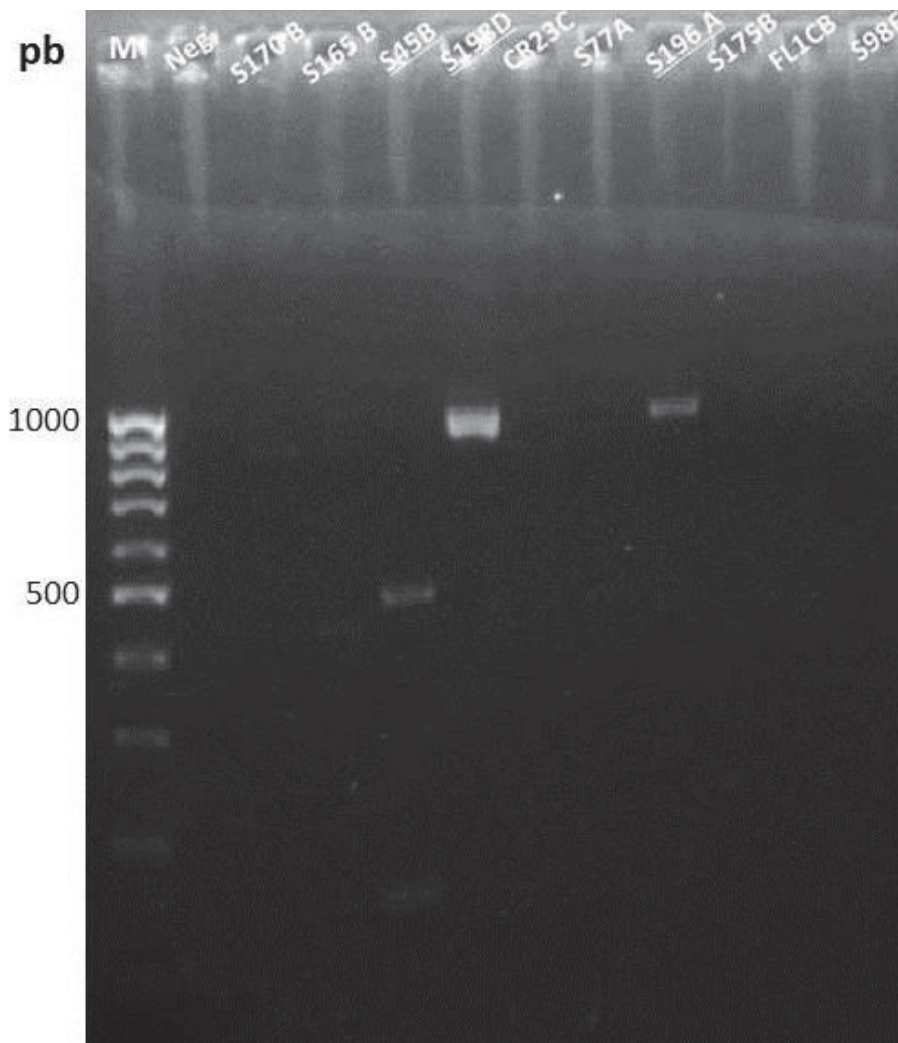
**Fig. 4:** Resultado dos perfis de restrição do gene 16S, obtidos por digestão com *AluI* em gel de agarose a 2%, para os isolados identificados. Legenda: M, marcador 100pb DNA Ladder; Neg., Controle negativo; Bti., controle positivo.



## Pesquisa de Genes codificantes de Parasporinas

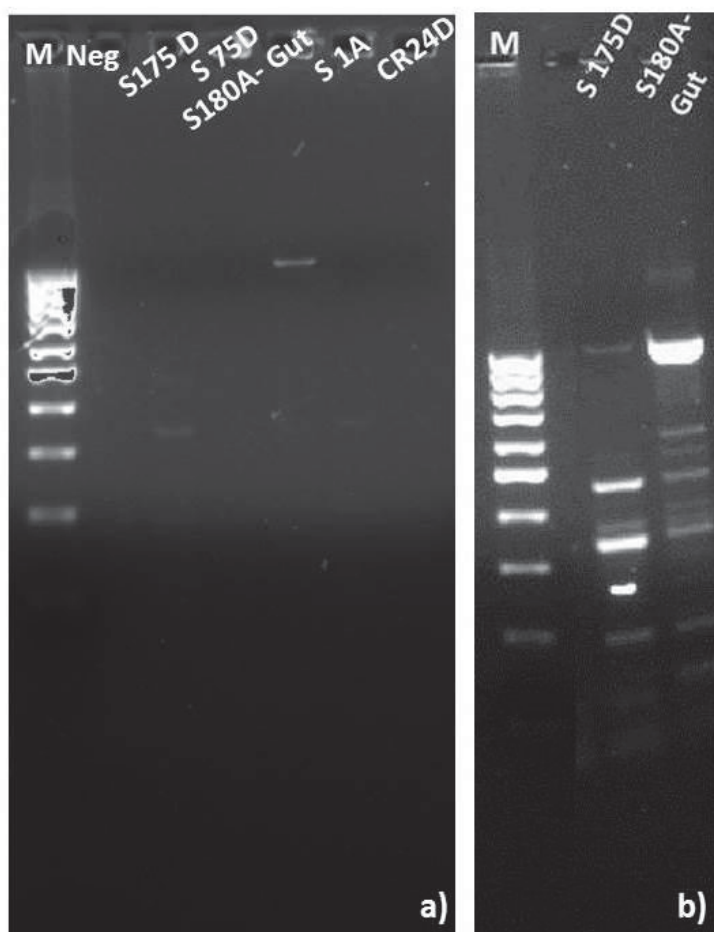
O *screening* de isolados positivos para a presença de genes *ps1* por amplificação com os primers *ps1F* e *ps1R* a uma temperatura de annealing de 55°C, mostrou que o isolado S45 B apresenta um produto de PCR de 500pb (fig.5). Já os isolados S198 D e S196 A apresentaram produtos de PCR de 1000pb (fig. 5). Estes produtos de PCR obtidos não apresentaram os esperados 737pb de acordo com a bibliografia (Espino-Vázquez *et al.*; 2012).

**Fig.5.:** Resultado da amplificação de produtos de PCR para *ps1* para os isolados dos pools 4 e 11, respetivamente. Resultados obtidos com temperatura de annealing de 55°C em gel de agarose a 1.8%. Legenda: M., marcador ladder 100pb; Neg., controlo negativo, 5 isolados pool 4 e 5 isolados pool 11.



Na pesquisa do gene *ps5* por amplificação com os primers *ps5F* e *ps5R* obtivemos um produto de PCR no pool 2. A identificação dos isolados positivos mostrou que o isolado S175 D apresentava um produto de amplificação de cerca 400pb utilizando temperatura de annealing de 53,5°C (fig.6 a). Quando preparamos o mix de PCR com o dobro da Taq polymerase (0,2µl) e adicionamos 1µl de DNA das amostras, em vez de 2µl, e alteramos as condições de PCR para 35 ciclos com uma temperatura de annealing de 54°C, obtivemos um produto de PCR de cerca 300pb (fig.6 b). Ambos os valores são aproximados dos 414pb esperados (Espino-Vázquez *et al.*; 2012). O isolado S180-Gut apresentou um produto de PCR de 1000pb em ambas as condições.

**Fig. 6.:** Resultado dos produtos de PCR amplificados para o gene *ps5* nos isolados do pool positivo, aplicando diferentes condições de amplificação. Em a) a temperatura de annealing foi de 53,5°C, gel de agarose a 1,5%. Em b) temperatura de annealing foi de 54°C, em gel de agarose a 1,8%. Legenda: M., marcador ladder 100pb; Neg., controlo negativo; isolados do pool 2.



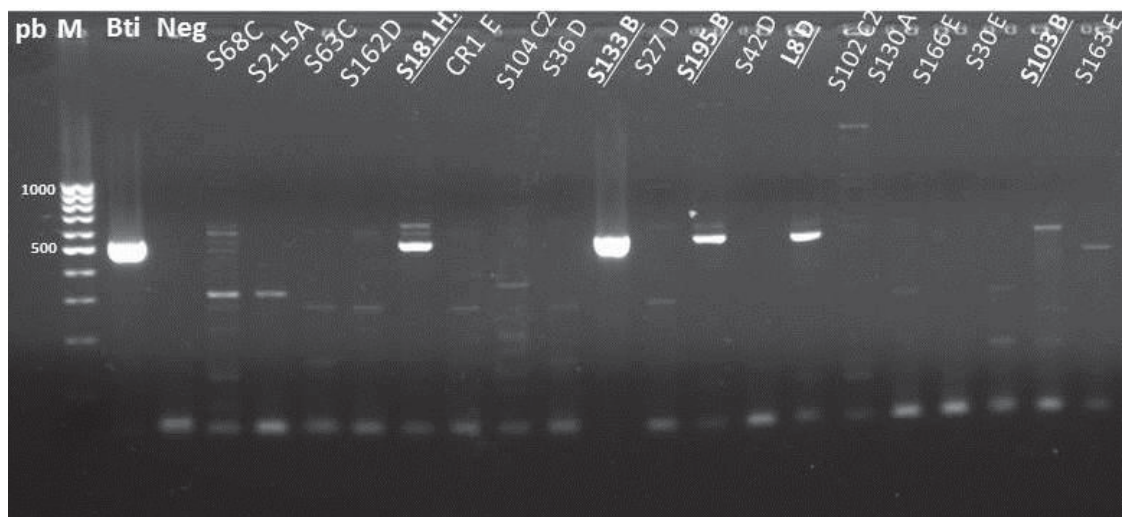
Os produtos de PCR de ambos os isolados foram purificados e enviados para sequenciação.

No *screening* para os genes *ps2*, *ps3*, *ps4* e *ps6* não obtivemos qualquer produto de PCR para as condições testadas.

### Pesquisa de Genes codificantes *cyt*

Na identificação de genes *cyt1*, os isolados que apresentaram um produto de amplificação com cerca de 500pb, tal como o controlo positivo (Bti), foram S181 Hemo, S133 B, S195 B, L8D e S103 B (fig. 7). Este resultado encontra-se próximos dos 522pb e dos 525pb esperados (Bravo *et al.*; 1998). Os produtos de PCR obtidos nos isolados S133B, S195 B e L8D como apresentaram uma boa amplificação, foram purificados, quantificados e enviados para sequenciação. Para os restantes isolados não foi possível obter DNA em quantidade suficiente para a purificação.

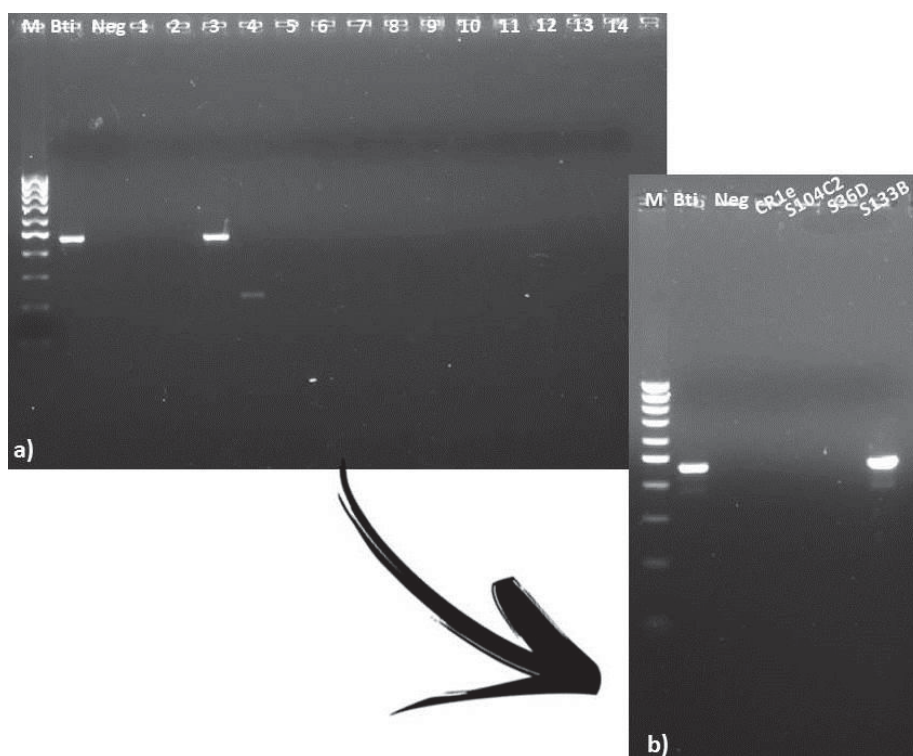
**Fig. 7.:** Resultado da amplificação de produtos de PCR para o gene *cyt1* dos isolados dos pool positivos. Os isolados identificados a sublinhado são os isolados com produtos de PCR de 500pb. Legenda: M., marcador Ladder 100pb; Bti, controlo positivo; Neg., controlo negativo.



Na identificação de genes *cyt2*, houve amplificação com um produto de PCR com cerca de 500pb no pool 3. Ao analisarmos os resultados de amplificação dos isolados desse mesmo pool, obtivemos um produto de PCR com esse mesmo tamanho no isolado

S133 B (fig. 8). Este valor encontra-se próximo dos 469pb esperado para *cyt2*, de acordo com a bibliografia (Vidal-Quist *et al.*; 2008).

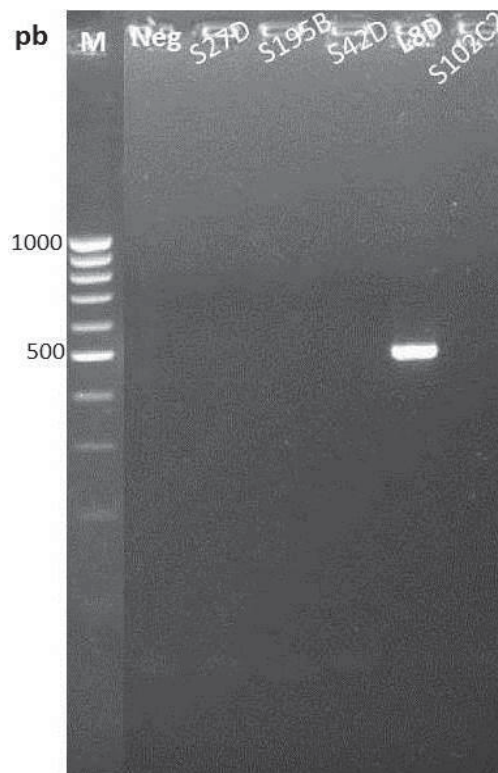
**Fig. 8:** Resultado da amplificação de PCR para a identificação do gene *cyt2*. Em a) temos o resultado da amplificação dos 14 pool de DNA, onde o pool 3 amplificou com um produto de peso molecular semelhante ao controlo positivo (Bti). Em b) temos a identificação do gene nos isolados do pool 3, onde o isolado S133 B apresenta um produto de amplificação com cerca de 500pb. Legenda: M, marcador ladder 100pb; Bti, controlo positivo; Neg controlo negativo.



### Pesquisa de Genes codificantes para Cry Nematicidas

Aquando a análise dos produtos de PCR para a amplificação de genes que codificam para Cry com atividade nematicida, utilizando os primers gerais *gral\_nemF* e *gral\_nemR* obtivemos um produto de PCR com cerca de 500pb no isolado L8D, isolado presente no pool 8 (fig. 9). Este valor encontra-se próximo dos valores esperados (474, 477, 483 e 489pb) (Vidal-Quist *et al.*; 2008).

**Fig. 9:** Resultado da amplificação por PCR para a identificação de genes *cry* nematicidas nos isolados do pool positivo em gel de agarose a 2%. Legenda: M, marcador ladder 100pb; Neg. Controlo negativo.



### Sequenciação

Após a análise das amplificações para os genes em estudo, purificamos os produtos de PCR dos isolados com produtos de amplificação de interesse, de modo a enviar para sequenciação (tabela 11).

**Tabela. 11.:** Listagem de isolados e respectivos produtos de PCR sequenciados para os genes em estudo.

Isolado	Gene em análise	Produto de PCR (pb)
S45 B	<i>ps1</i>	500
S196 A	<i>ps1</i>	1000
S198 D	<i>ps1</i>	1000
S175D	<i>ps5</i>	300
S175D	<i>ps5</i>	400
L8D	<i>cyt1</i>	500
S133 B	<i>cyt1</i>	500
S133 B	<i>cyt2</i>	500
L8D	<i>nem</i>	500

### Tratamento das Sequências

As sequências *forward* e *reverse* obtidas para cada um dos produtos de PCR, foram alinhadas utilizando o BioEdit Sequence Alignment Editor, obtendo-se as sequências consenso para cada fragmento em análise (anexo II). As sequências consenso foram analisadas recorrendo à ferramenta Blastn do NCBI que nos dá a homologia da sequência do nosso fragmento com sequências disponíveis na base de dados.

#### ✓ Parasporina 1

**Tabela 12.:** Resultado da análise por Blastn, das sequências consenso obtidas para os produtos de amplificação resultantes do screening para o gene *psI*.

Isolado	Gene	Organismo	Id. (%)	E. Value	Nº Acesso
S45 B	dihydroxy-acid dehydrataseketol-acid reductoisomerase	<i>Bacillus mycoides</i> strain ATCC 6462	99	0.0	CP009692.1
S196 A	master regulator for biofilm formationdimethylallyla denosine tRNA methylthiotransferase	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HS18-1	95	0.0	CP012099.1
S198 D	master regulator for biofilm formationdimethylall yladenosine tRNA methylthiotransferase	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HS18-1	94	0.0	CP012099.1

De acordo com as homologias descritas na tabela 12, os produtos de PCR obtidos na pesquisa de genes para *psI* não apresentaram homologia com os referidos genes.

✓ **Parasporina 5**

**Tabela 13.:** Resultado da análise por Blastn, das sequências consenso obtidas para os produtos de amplificação resultantes do screening para o gene *ps5*.

Isolado	Gene	Organismo	Id. (%)	E. Value	Nº Acesso
S175 D (300pb)	proton/sodium-glutamate symport protein	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD1002	91	2,00E-53	CP009351.1
S175 D (400pb)	hypothetical protein	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar morrisoni strain BGSC 4AA1	87	4,00E-124	CP010577.1

De acordo com as homologias descritas na tabela 13, os produtos de PCR obtidos na pesquisa de genes para *ps5* não apresentaram homologia com os referidos genes.

✓ **Genes *cyt***

**Tabela 14.:** Resultado da análise por Blastn, das sequências consenso obtidas para os produtos de amplificação resultantes do screening para os genes *cyt1* e *cyt2*.

Isolado	Gene	Organismo	Id. (%)	E. Value	Nº Acesso
L8D	NADPH:quinone reductase	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HS18-1	96	0.0	CP012099.1
		<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518	96	0.0	CP005936.1
		<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar thuringiensis str. IS5056	96	0.0	CP004123.1
S133B	27KDa crystal protein	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	0.0	Y00135.1
	Cytolytic toxin Cyt1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain LLP29	99	0.0	DQ302752.2
	Cytolytic insecticidal protein 1 (cyt1Aa)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	0.0	DQ200984.1
	Cyt2Ba	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis strain HD-567	99	0.0	GQ919039.1
	Cyt2Ba	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain INTA 160-2	99	0.0	FJ205865.1
	Cytolytic toxin Cyt2Ba7 (cyt2Ba7)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	0.0	AF215645.1

Analisando as homologias obtidas para as sequências consenso, verificamos que os produtos de PCR obtidos para o isolado S133B possuem elevada identidade com os genes *cyt1* e *cyt2* de várias estirpes de Bt. Este resultado indica que o isolado S133B possui os genes codificantes para as proteínas Cyt. A sequência obtida para o isolado L8D apresentou homologia com sequências conhecidas genes codificantes de NADPH:quinone reductase, não apresentando homologia com genes codificantes de *cyt1*.

✓ *cry* nematicida

**Tabela 15.:** Resultado da análise por Blastn, das sequências consenso obtidas para os produtos de amplificação resultantes do screening para os genes *cry* nematicidas.

Isolado	Gene	Organismo	Id. (%)	E. Value	Nº Acesso
L8D	Cry21Ha1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain DB27	75	1,00E-14	KF771886.1
	Cry21Ba2-like protein	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Sbt072	75	3,00E-14	JF521578.1
	Cry21Ba1-like protein	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Sbt072	75	3,00E-14	JF521577.1

A análise da sequência consenso obtida para o isolado L8D revela uma identidade de 75% com sequências conhecidas de genes codificantes para 3 subfamílias da proteína Cry21, descritas como tendo atividade nematicida.

O resultado positivo para o gene nematicida *cry21* foi confirmado pela análise dos cristais e por ensaios de atividade contra nematodes. Para tal os cristais do isolado L8D e do S133B foram obtidos após cultura em meio T3 e lavagem de acordo com o método de Lenina *et al.*; 2014.

### Solubilização das Proteínas

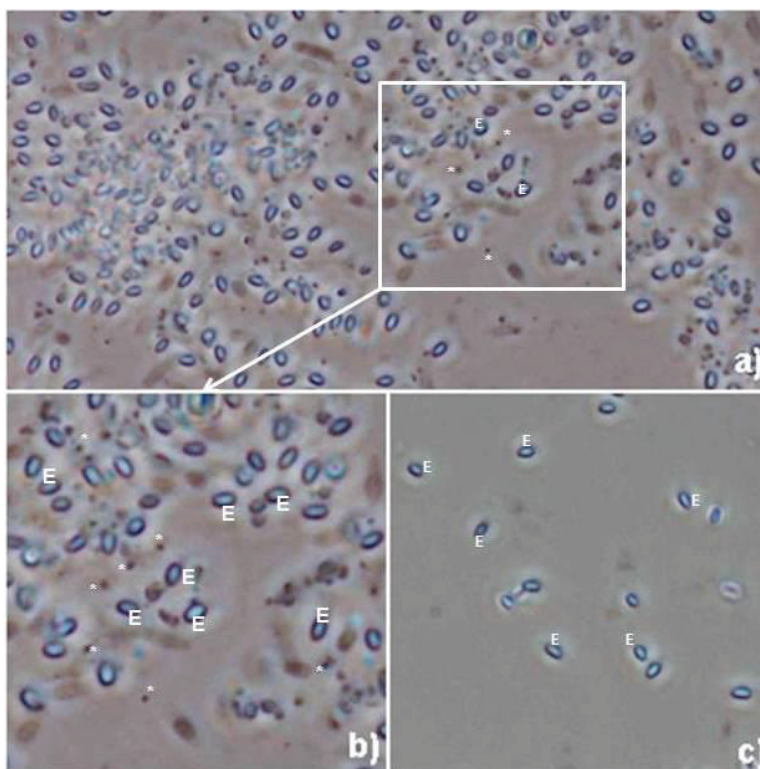
Os cristais dos isolados S133 B e L8D foram solubilizados por incubação em tampão carbonato + DTT a diferentes tempos. A proteína foi quantificada estando os

valores obtidos apresentados na tabela 16. Este processo foi ainda acompanhado por visualização dos cristais em microscopia óptica de contraste de fase em cada um dos intervalos de tempo indicados. Nos tempos iniciais foi possível visualizar os cristais, mas passadas 6 horas o número de cristais visíveis diminuiu significativamente, indicando a sua solubilização. (fig 10 e fig 11).

**Tabela 16:** Quantificação de proteína solubilizada dos cristais dos isolados S133 B e L8D em diferentes períodos de tempo de incubação: 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h e 16h.

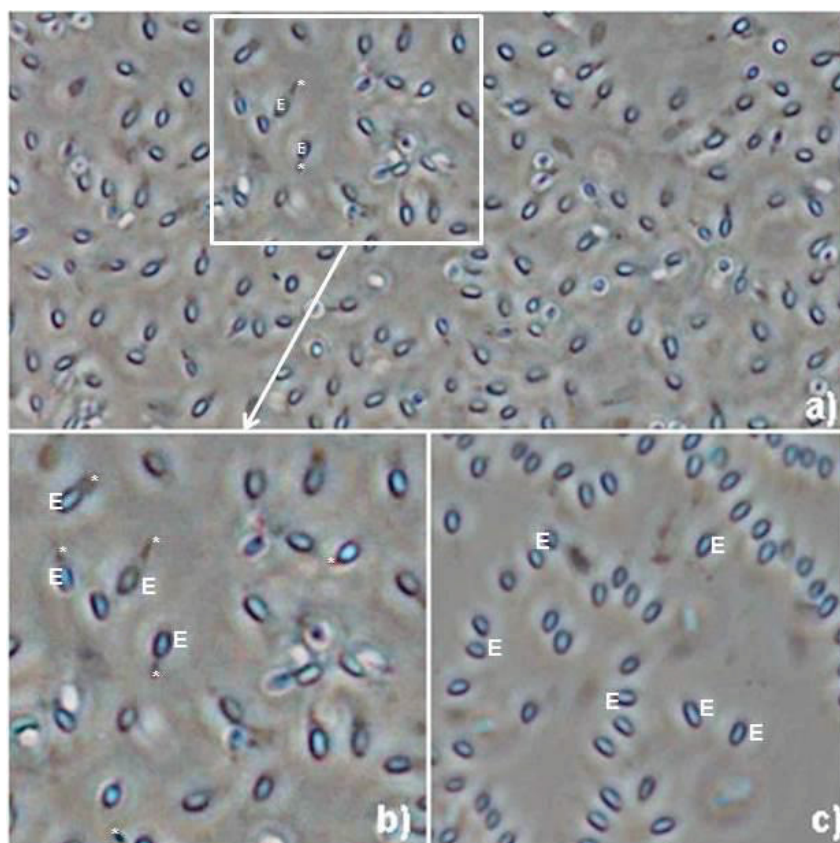
Tempo (h)	S133 B (mg/ml)	L8D (mg/ml)
0	-1,082	0,703
1	0,120	1,930
2	1,270	1,869
4	3,913	1,713
6	1,802	1,578
16	5,463	4,449

**Fig. 10:** Observação microscópica (X1000) dos cristais do isolado S133B submetidos a vários tempos de incubação em tampão de solubilização. Em a) e b) temos os cristais no tempo 0h e sendo b) uma ampliação da região identificada em a). Nestas imagens é possível visualizar as



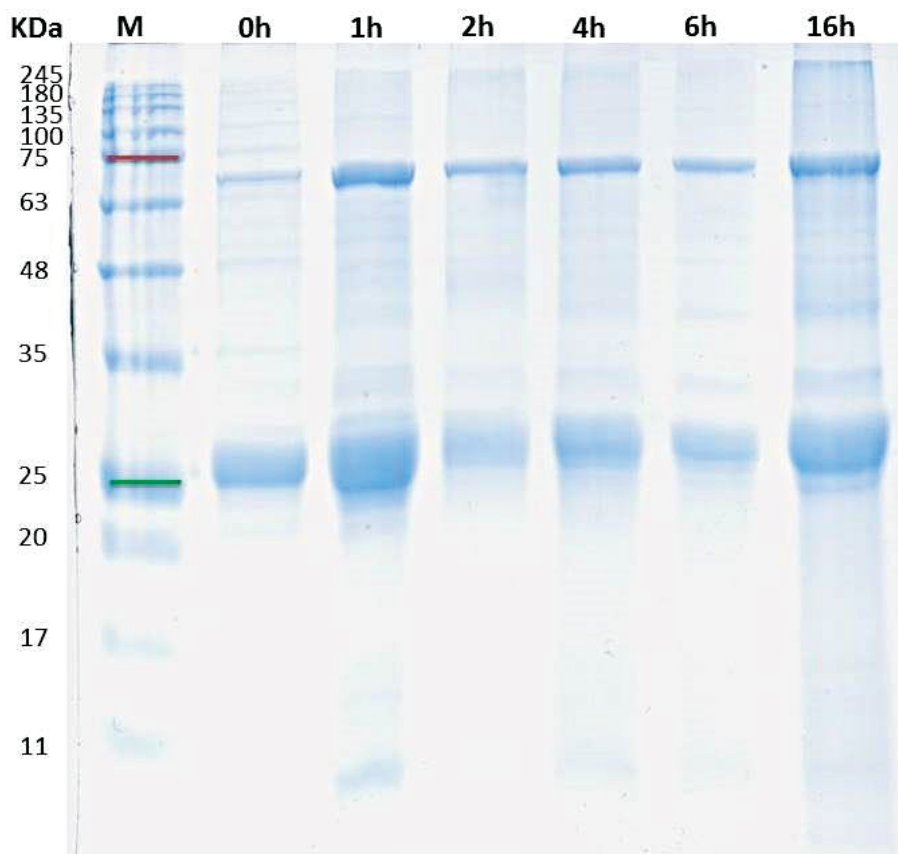
inclusões sob a forma de cristal com morfologia esférica (\*). Já na imagem c), que reporta a solubilização passadas 6h, já não é possível visualizar os cristais de modo significativo quando comparado com o tempo 0h. Legenda: E – esporo; (\*) - inclusão (cristal).

**Fig. 11:** Observação microscópica (X1000) dos cristais do isolado L8D submetidos a vários tempos de incubação em tampão de solubilização. Em a) e b) temos os cristais no tempo 0h e sendo b) uma ampliação da região identificada em a). Nestas imagens é possível visualizar as inclusões sob a forma de cristal associado ao esporo (\*). Por sua vez em c), que traduz a solubilização passadas 6h, já não é possível visualizar os cristais de modo significativo quando comparado com o tempo 0h. Legenda: E – esporo; (\*) - inclusão (cristal).



As proteínas solubilizadas de ambos os isolados foram visualizadas em SDS-PAGE estando os resultados nas figuras 12 e 13.

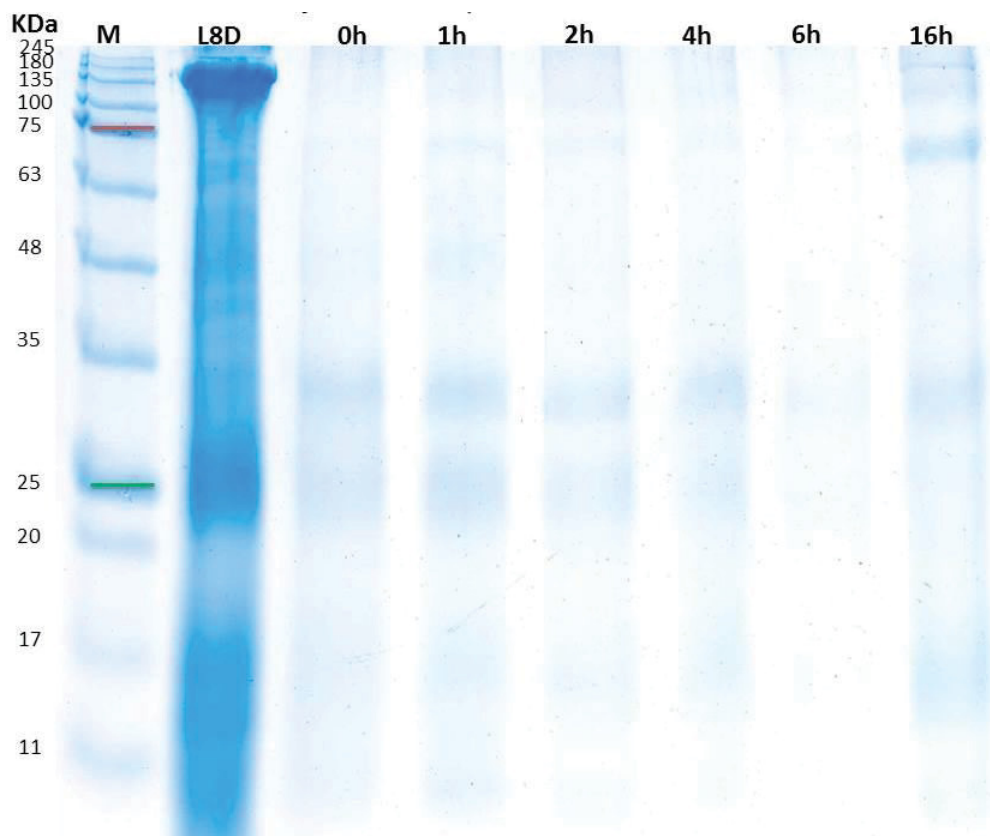
**Fig. 12:** Perfil SDS-PAGE de proteína solubilizada do isolado *B. thuringiensis* S133 B em vários tempos de solubilização. M – marcador onde a banda vermelha representa 75 KDa, enquanto a banda verde corresponde a uma proteína de 25KDa.



De acordo com a visualização do gel (fig. 12) em todas as amostras temos duas bandas de coloração mais intensa de aproximadamente 25KDa e com cerca de 70 KDa.

Quando analisamos os resultados da solubilização dos cristais do isolado L8D, verificamos que a quantidade de proteína é baixa, sendo difícil identificar as bandas. Na amostra não solubilizada (L8D) temos uma grande quantidade de proteína entre os 135 e os 180 KDa (fig.13).

**Fig.13:** Perfil SDS-PAGE de proteína solubilizada do isolado *B. thuringiensis* L8D em vários tempos de solubilização, bem como uma amostra de proteína não solubilizada (L8D). M – marcador onde a banda vermelha representa 75 KDa enquanto a banda verde simboliza o peso de 25 KDa.

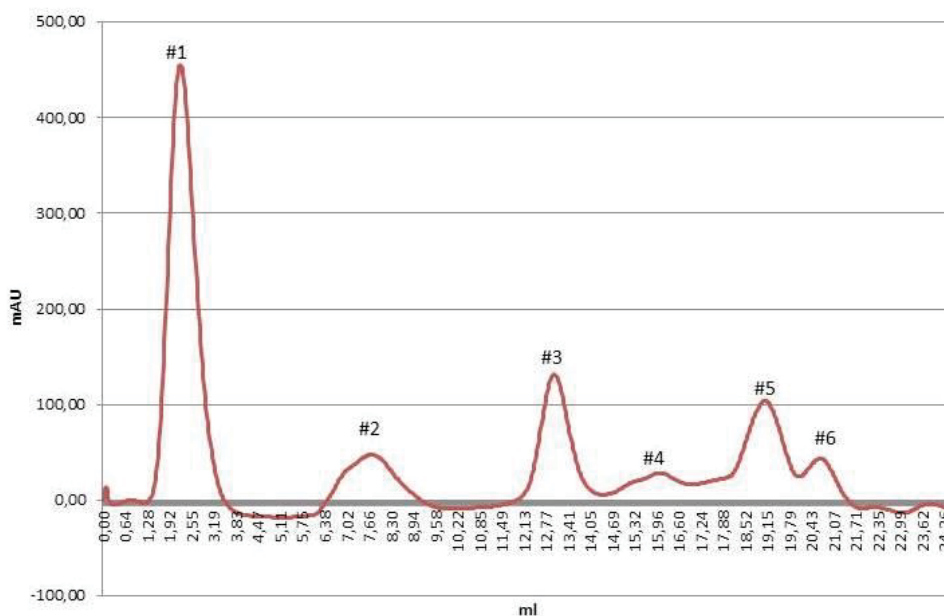


Da cromatografia de exclusão molecular realizada a uma amostra de cristais solubilizados em 1h de incubação, com 13,984mg/ml de proteína resultaram 6 fracções distintas (Gráfico 1). A quantidade de proteína de cada fracção apresenta-se na tabela 17.

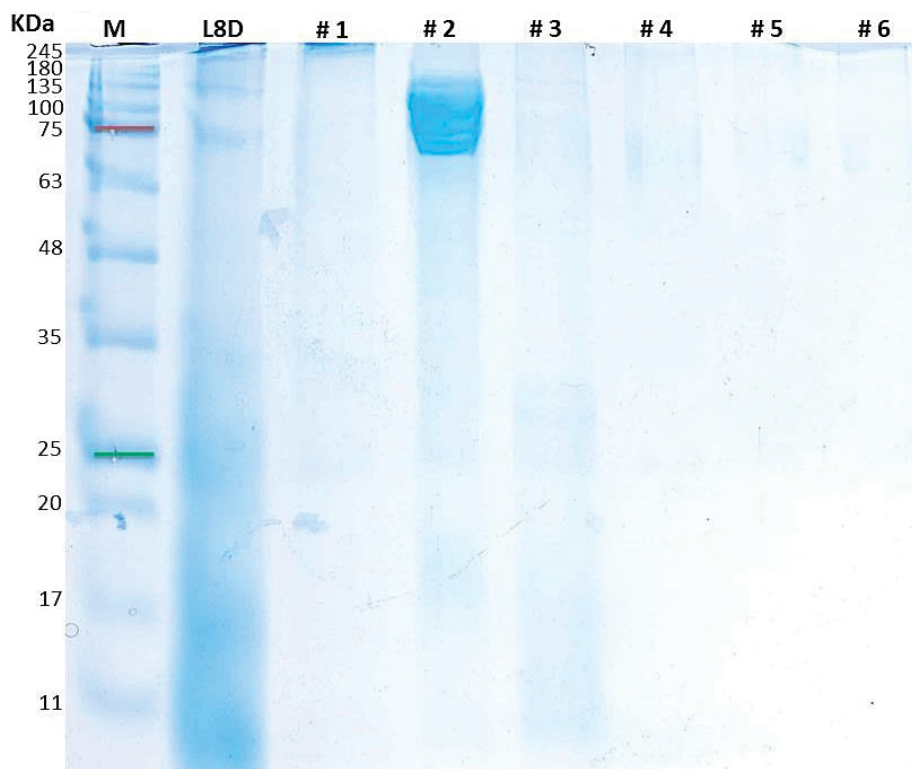
**Tabela 17.:** Quantificação de proteína das amostras fraccionadas resultantes da cromatografia de exclusão molecular.

Fracção	Proteínas (mg/ml)
#1	0,229
#2	1,380
#3	0,650
#4	-0,050
#5	0,033
#6	0,085

**Gráfico 1.:** Cromatograma obtido da cromatografia por exclusão molecular da qual resultaram as seis fracções da amostra de cristais de L8D solubilizados. Legenda: mAU – absorbância.



**Fig.14:** Perfil SDS-PAGE das fracções obtidas na gel filtration de *B. thuringiensis* L8D, bem como a amostra solubilizada do mesmo isolado (L8D). M – marcador onde a banda vermelha representa 75 KDa, enquanto a banda verde simboliza o peso de 25 KDa.



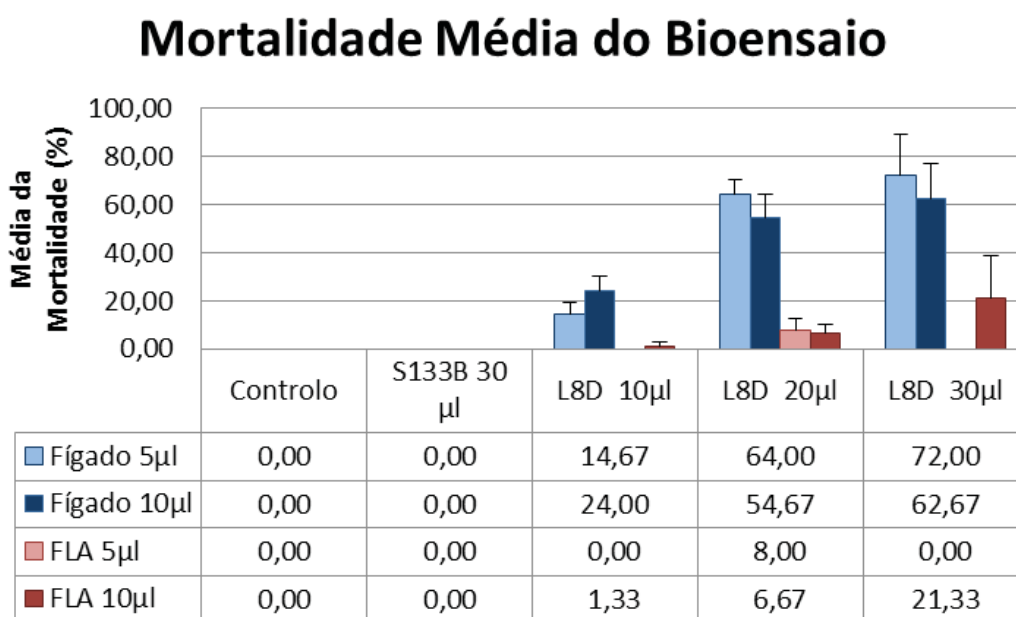
Com a visualização do gel (fig. 14) onde se aplicaram as fracções resultantes do fraccionamento, verificou-se que a baixa concentração de proteína não permitiu identificar bandas visíveis nas fracções 1, 3, 4, 5 e 6. No entanto, a fracção 2 apresenta proteína entre 180 e os 70 KDa.

### **Teste de Atividade para pesquisa de atividade Nematicida**

Nos ensaios realizados em placa com meio sólido FLA o crescimento da bactéria simbiote do nematode, e que constitui a sua principal fonte de alimento, cobriu a placa tornando difícil a visualização dos nematodes não permitindo registar resultados.

Nos ensaios realizados em meio líquido em placa de 96 poços, com proteína na forma de cristal, não obtivemos mortalidade quer nos controlos, quer nos poços tratados com o isolado S133B. No entanto, quando passamos à observação dos nematodes nos poços tratados com os cristais do isolado L8D obtivemos mortalidade quer no meio FLA, quer no meio Fígado. De acordo com os valores apresentados no gráfico 2, temos que a mortalidade aumenta com o aumento da quantidade de cristais aplicados. Quando analisamos a mortalidade em ambos os meios testados, temos que a mortalidade é maior no meio de fígado, comparativamente com a mortalidade verificado nos poços com meio FLA.

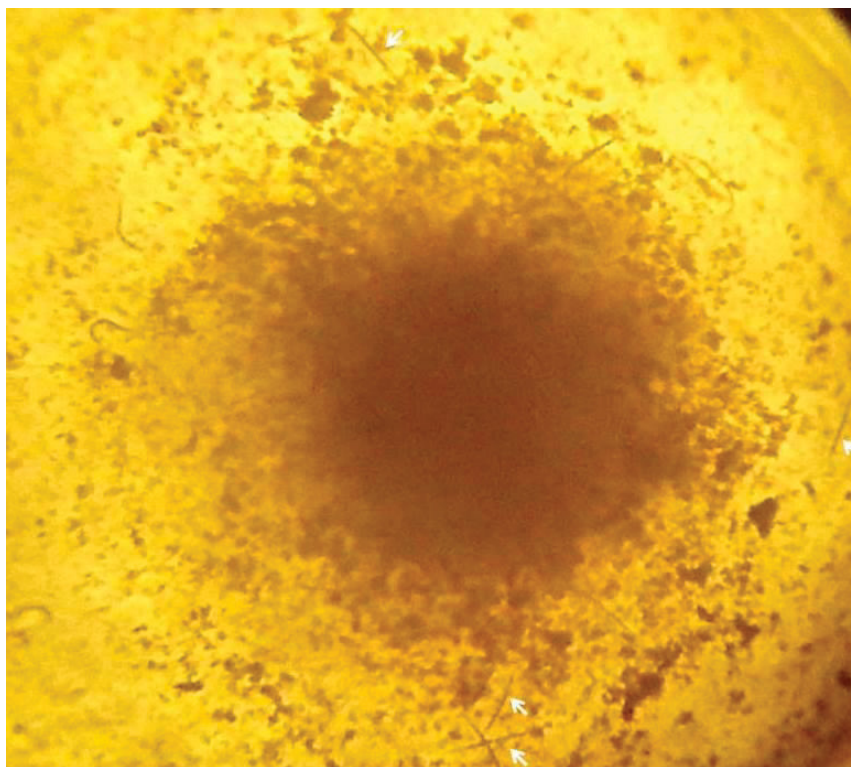
**Gráfico 2:** Resultado do valor médio de mortalidade do ensaio realizado com meio FLA e meio fígado testando 5 e 10µl de cada meio, bem como quantidades distintas de tratamento com cristais do isolado L8D (10, 20 e 30 µl). Como controlo negativo aplicamos 30 µl de cristais do isolado S133 B e no controlo nenhum tratamento foi aplicado.



Os resultados do teste de atividade mostraram mortalidade apenas nos poços de tratamento com cristais do isolado L8D, sendo que nos poços de controlo não se registou nenhum IJ morto. Obtivemos para os poços com 5µl de meio fígado com 10µl

de tratamento uma mortalidade média de  $15\% \pm 4.8$  de erro padrão, para  $20\mu\text{l}$  de tratamento  $64\% \pm 6.11$  e para  $30\mu\text{l}$   $72\% \pm 28.9$ . Quando verificamos o mesmo tratamento para os poços com  $10\mu\text{l}$  de meio fígado temos,  $24\% \pm 6.1$ ,  $55\% \pm 9.3$  e  $63\% \pm 14.1$ , para  $10\mu\text{l}$ ,  $20\mu\text{l}$  e  $30\mu\text{l}$ , respectivamente. Já os valores médios da mortalidade com  $5\mu\text{l}$  de meio FLA são de  $8\% \pm 4.6$  para o tratamento com  $20\mu\text{l}$  de cristais, não sendo verificada mortalidade nos restantes tratamentos. Quando analisamos os valores nos poços com  $10\mu\text{l}$  de meio FLA temos valores médios de mortalidade de  $1\% \pm 1.3$  no tratamento com  $10\mu\text{l}$  de cristais de L8D,  $7\% \pm 3.5$  com  $20\mu\text{l}$  de cristais e de  $21\% \pm 17.5$  no tratamento com  $30\mu\text{l}$  de cristais. Os valores da mortalidade aumentam com o aumento da quantidade de cristais aplicados nos poços com o tratamento referido, no entanto os valores entre as repetições são heterogéneos.

**Fig. 14:** Fotografia da observação à lupa (6X) a um dos poços do ensaio com meio fígado e tratamento com  $15\mu\text{l}$  de cristal do isolado L8D passadas 48h do início do ensaio, indicando as setas indivíduos já mortos. Legenda: Seta branca – indivíduo morto.



Quanto aos resultados do ensaio onde a proteína aplicada fora previamente solubilizada e o meio fora substituído por tyrode com 2% de hemolinfa de insecto, não se observou mortalidade dos nematodes. Das várias observações realizadas diariamente durante cerca de 15 dias após o início do ensaio, os IJ's colocados nos vários poços apresentavam todos o mesmo comportamento, isto é, apresentavam mobilidade. Quando comparado o comportamento dos IJ's dos poços de controlo com os dos poços de tratamento com cristais solubilizados de S133 B e L8D verificamos que o comportamento é semelhante não sendo observado qualquer IJ morto ou com mobilidade reduzida.

## Discussão

No presente estudo foi realizado um *screening* de genes codificantes para proteínas citotóxicas e nematicidas em isolados de *Bacillus thuringiensis* dos Açores, tendo os isolados utilizados sido colhidos maioritariamente na ilha de São Miguel. Os isolados recolhidos na Ilha de São Miguel são identificados pela letra S, mas também foram analisados isolados das ilhas do Corvo (CR), Flores (FL) e Faial (L), resultando numa amostra inicial de 89 isolados.

### Observação dos Isolados em Microscopia Óptica de Contraste de Fase

Visto que *Bacillus thuringiensis* é caracterizado pela produção de inclusões cristalinas de origem proteica durante a esporulação, fomos primeiramente analisar os isolados quanto à presença das referidas inclusões designadas de cristal. As morfologias esférica, amorfa, associada ao esporo e bipiramidal foram as selecionadas para a referida pesquisa, por não apresentarem atividade inseticida, sendo associadas à presença de atividade citotóxica e nematicida de acordo com a bibliografia (Ohba *et al.*; 2009). Após a primeira análise microscópica a todos os isolados, os que não apresentaram cristal foram excluídos do estudo por não serem classificados como *B. thuringiensis*, sendo eles S4 B, S21 A, S91 C, S94 E<sub>2</sub>, S149 A, S149 C e S213 D. No entanto, aquando esta avaliação alguns isolados suscitaram dúvidas quanto à classificação como *B. thuringiensis*, por não apresentarem cristal em todas as células ou por não ser fácil a identificação da inclusão cristalina.

### Análise de Restrição do gene 16S

De modo a garantir que os isolados para a pesquisa de genes codificantes para proteínas citotóxicas e nematicidas eram Bt's, realizamos a análise de restrição do gene 16S para os isolados que suscitaram dúvidas na sua classificação pela observação em microscopia de contraste de fase. Para tal os perfis obtidos foram comparados com o perfil de *B. thuringiensis* para que se pudesse classificar como pertencente ao grupo de espécies relacionados com *Bacillus cereus* ou não. Na análise dos perfis de restrição obtidos para os isolados S76 C, S103 D-G, S149 B, S150 E, S168 A, S218 E, S225 D,

S218 D, S26 E, S54 D, S148 D e S179 B verificamos que estes não apresentaram perfis esperados para *B. cereus*, pelo que foram eliminados dos isolados em estudo, restando 70 isolados para a realização do *screening* de genes codificantes para proteínas citotóxicas e nematicidas.

### **Pesquisa de genes para as Parasporinas**

Passando ao *screening* de genes codificantes para proteínas citotóxicas, iniciamos a análise pela identificação de genes para as parasporinas, sendo que esta pesquisa desperta grande interesse devido à sua referência em vários estudos onde a sua actividade anticancerígena fora testada com sucesso em determinadas linhagens celulares (Saitho *et al.*; 2006; Ohba *et al.*, 2009; Okumura *et al.*; 2014). A identificação destas proteínas em isolados de Bt, foi inicialmente desenvolvida no sentido da identificação de proteínas activas, testando as proteínas dos cristais sobre culturas de tecidos (Ohba *et al.*; 2009). O conhecimento sobre os genes codificantes para estas proteínas permitiu a utilização de estratégias de *screening* dirigidas para a identificação dos genes por utilização de primers desenhados para zonas conservadas nos genes das parasporinas (Lenina *et al.*; 2013; Espino-Vázquez *et al.*; 2012). A utilização de uma estratégia deste tipo foi usada por Espino-Vázquez em 2012 com a identificação de isolados positivos num *screening* de uma colecção. Neste trabalho a metodologia utilizada foi semelhante, tendo o *screening* dos 70 isolados sido feito com os primers *forward* e *reverse ps1, ps2, ps3, ps4, ps5* e *ps6*. No nosso estudo foi usado uma estratégia de *screening* sequencial, em que, numa primeira etapa o DNA dos 70 isolados foi agrupado em conjuntos de 5 e o DNA de cada pool foi utilizado como DNA molde em cada uma das reacções de PCR. Numa etapa seguinte, na reacção de PCR utilizou-se o DNA de cada um dos isolados que constituía o pool positivo. Deste modo foi possível fazer um rastreio rápido da colecção de isolados de Bt.

Obtivemos produtos de amplificação nas reacções de PCR em que se utilizaram os primers para as parasporinas *ps1* e *ps5*. Já na pesquisa de genes codificantes para as restantes famílias de Parasporinas nenhum produto de PCR foi amplificado nas condições utilizadas. Quanto aos produtos de PCR resultantes da análise para *ps1*, foram obtidos fragmentos com 1000pb com grande intensidade de amplificação nos

isolados S196 A e S198 D, bem como amplificação com 500pb no isolado S45 B. Apesar da dimensão do fragmento esperado ser de 737pb, os produtos de amplificação foram purificados e foram enviados para sequenciação (Espino-Vázquez *et al.*; 2012).

Após o tratamento das sequências, e obtendo a sequência consenso, estas foram analisadas recorrendo ao Blastn de modo a obter as homologias com sequências existentes na base de dados. Nenhuma das três sequências obtidas apresentou homologias com genes de parasporinas 1, apresentando homologias elevadas de genes codificantes para dihydroxy-acid dehydrataseketol-acid reductoisomerase e master regulator for biofilm formationdimethylallyladenosine tRNA methylthiotransferase de estirpes de *B. mycoides* e *B. thuringiensis*, respectivamente.

Já na identificação de genes das Parasporinas 5, obtivemos produtos de PCR com aproximadamente 400 e 300pb para o isolado S175 D, os quais foram para sequenciação por apresentarem tamanho próximo dos esperados 414pb (Espino-Vázquez *et al.*; 2012). Ao verificar as homologias das sequências obtidas utilizando Blastn no NCBI não obtivemos homologia com genes de parasporinas 5, apresentando homologias elevadas para genes codificantes de proton/sodium-glutamate symport protein e de uma hipotética proteína de estirpes de *B. thuringiensis*.

Considerando estes resultados, temos que na pesquisa de genes codificantes para as parasporinas neste grupo de isolados de *Bacillus thuringiensis* dos Açores, com as referidas condições, não foram identificados genes codificantes para parasporinas.

### **Pesquisa de genes *cyt***

Assim passamos à identificação de genes *cyt1* e *cyt2*, onde utilizamos como controlo positivo o isolado *Bacillus thuringiensis israelensis* como estirpe de referência.

Para a identificação de genes codificantes para Cyt1, onde o tamanho esperado do produto de PCR era de 522 e 525pb, obtivemos amplificações de aproximadamente 500pb para os isolados S181 Hemo, S133 B, S195 B, L8D e S103B (Bravo *et al.*; 1998).

Destes isolados, apenas foi possível purificar os produtos de PCR obtidos para os isolados S133 B, S195 B e L8D. Dos isolados S181 Hemo e S103B não foi possível purificar, pois a amplificação não era tão intensa quando comparada com a amplificação obtida nos restantes isolados, não sendo possível purificar quantidade de DNA suficiente para a sequenciação.

Já para na identificação de genes codificantes para Cyt2 obtivemos um produto de PCR de 500pb no isolado S133 B, sendo este valor próximo dos 469pb esperados (Vidal-Quist *et al.*; 2008). Desse modo, o produto de PCR obtido foi purificado e enviado para sequenciação.

De acordo com a análise das sequências obtidas realizando Blastn no NCBI apenas o isolado S133 B apresenta genes codificantes para Cyt1 e Cyt2 obtendo-se homologias elevadas nas análises das referidas sequências. Para Cyt1 verificamos identidade de 99% com gene *cyt1Ar* de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* strain RJ98, com gene *cyt1* de *Bacillus thuringiensis* strain LLP29 e com gene *cyt1A97* de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, entre outros. Quando avaliamos a sequência do fragmento do mesmo isolado proveniente da pesquisa de genes para Cyt2, os resultados foram identidades de 99% com genes *cyt2Ba*, *cyt2Ba8*, bem como identidades de 98% e de 80% com *cyt2Ba7* e *cyt2Aa*, respectivamente.

Desse modo, podemos confirmar a presença de genes codificantes para proteínas Cyt1 e Cyt2 no isolado S133 B. Apesar da sua atividade contra células cancerígenas não ter sido testada no presente trabalho, podemos referir, de acordo com a bibliografia, que estas proteínas apresentam potencial atividade contra células cancerígenas humanas, sendo capazes de provocar o desequilíbrio osmótico que provoca a lise da célula (Cohen *et al.*; 2007; Kitada *et al.*; 2005; Okumura *et al.*; 2014). O estudo do modo de acção destas proteínas produzidas pelo isolado S133B, poderá dar pistas para uma possível aplicação sobre células cancerígenas (Cohen *et al.*; 2007; Kitada *et al.*; 2005; Okumura *et al.*; 2014).

### **Pesquisa de genes *cry***

Os 70 isolados de Bt foram avaliados para a presença de genes para proteínas nematicidas, utilizando os *primers* geral nematicida que podem detetar genes *cry5*, *cry12*, *cry14* e *cry21*.

Na análise dos produtos de PCR foi possível obter um produto de amplificação no isolado L8D, de cerca de 500pb, valor próximo dos esperados 479 a 489pb, no isolado L8D (Vidal-Quist *et al.*; 2008). O produto de PCR foi purificado e enviado para sequenciação, sendo os resultados tratados, obtendo-se a sequência consenso. A sequência consenso obteve homologia com apenas três fragmentos de *cry21*, apresentando valores de identidade de 75% com *cry21Hal*, *cry21Ba2* e *cry21Ba1*. Ao alinhar a sequência do nosso fragmento com as sequências com as sequências com que apresentara homologia verificamos que há uma grande variabilidade entre elas. De acordo com o sistema de nomenclatura, proteínas que partilham um valor de identidade inferior a 78% pertencem a uma nova subfamília de proteínas Cry (Palma *et al.*; 2014). Uma vez que obtivemos homologias do nosso fragmento com um valor próximo dos 78%, podemos estar perante uma proteína Cry21 de uma nova subfamília.

Desse modo podemos afirmar que este isolado possui um gene codificante para Cry nematicida, *cry21*, o qual apresenta diferenças com as sequências presentes na base de dados do NCBI, podendo estar associado uma nova subfamília de proteínas Cry21. Uma vez que esta proteína é descrita pela bibliografia como sendo capaz de atuar sobre nematodes que provocam parasitoses em humanos, e sendo a primeira do género encontrada em Bt's dos Açores, a sua atividade nematicida foi testada.

### **Solubilização, Cromatografia de Exclusão Molecular e SDS-PAGE**

De modo a avançar na caracterização das proteínas dos cristais, os cristais de ambos os isolados foram solubilizados. Dos resultados da quantificação de proteína solubilizada temos que os valores mais elevados de proteína foram obtidos passadas 16h de incubação em tampão carbonato (50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 10mM DTT) para ambos os isolados. Quando passamos as amostras em electroforese SDS-PAGE observamos que o valor de proteína quantificada após distintos períodos de incubação reflecte-se no

resultado apresentado no gel apresentando-se a maior intensidade na solubilização de 16h de incubação, ou seja, o período onde a proteína quantificada obteve maior valor. Quando analisamos o gel com as amostras dos vários tempos de incubação dos cristais do isolado L8D não conseguimos caracterizar o perfil proteico, visto a intensidade das bandas ser mínima.

Uma amostra de cristais solubilizados de L8D durante 1h de incubação com 13,984mg/ml de proteína, foi passada numa coluna Superdex 200 de exclusão molecular de modo a fraccionar a amostra de acordo com os diferentes tamanhos das partículas existentes na amostra. Ao quantificarmos as fracções e aos passarmos num SDS-PAGE apenas a fracção #2, fracção com valor mais elevado de proteína, apresentou bandas entre os 70 e os 180KDa. Ao verificarmos a amostra não solubilizada é visível uma região mais intensa de 130KDa. Esse peso é o esperado para proteínas Cry21 que de acordo com a bibliografia apresenta 135 a 140KDa (Jisha *et al.*, 2013; Iatsenko *et al.*; 2014).

Com os referidos resultados podemos concluir que é necessário otimizar o protocolo de solubilização, pois apesar de o protocolo utilizado ter sido seguido em estudos semelhantes, a nossa proteína de interesse como se encontra sob a forma de cristal associado ao esporo pode não estar a ser devidamente solubilizada não tendo sido possível avaliar o seu perfil proteico por SDS-PAGE.

### **Teste de Atividade para pesquisa de atividade nematicida**

Visto que ainda não se tinha descoberto genes nematicidas em *Bacillus thuringiensis* dos Açores, o isolado L8D foi o que despertou maior interesse para a caracterização da proteína, bem como para o teste de actividade.

Os resultados dos ensaios realizados com os cristais sobre o nemátodo *Heterorhbditis bacteriophora* demonstram claramente que os cristais de L8D provocam mortalidade (Gráfico 2). Nos ensaios, só há mortalidade nos poços com o tratamento de cristais do isolado L8D, não se verificando mortalidade nem nos poços de controlo, nem nos poços de controlo negativo, onde se adicionou cristais do isolado S133 B. Os resultados mostram ainda que a mortalidade é dose dependente, isto é, o aumento da

quantidade de cristais aplicado no ensaio, aumenta a mortalidade registada. Este resultado indica que, o isolado L8D produz uma proteína nematicida, que será codificada por um gene com homologia com o gene *cry21*. Quanto ao facto de os resultados obtidos em ambos os meios apresentarem uma menor mortalidade no meio FLA, este terá ocorrido pelo facto de o meio fígado ser um meio mais rico, que faz com que os nematodes ingiram maior quantidade de meio, ingerindo maior quantidade de cristais.

Apesar de as percentagens de mortalidade serem significativas, os valores de erro padrão são elevados pelo que é necessário otimizar o ensaio de modo a obter resultados homogéneos entre repetições e calcular a LD50.

Quando avaliamos os resultados do ensaio com proteína solubilizada não obtivemos mortalidade no tratamento com proteína solubilizada de L8D. Este resultado pode ter ocorrido devido ao facto da proteína com atividade nematicida não ter sido devidamente solubilizada pelo tampão utilizado. Visto apresentar cristal associado ao esporo o protocolo de solubilização pode não ter sido eficaz na solubilização da proteína de interesse. Por outro lado o ensaio realizado com proteína solubilizada demonstra que os nematodes podem não ter perdido a cutícula pela lavagem com solução de Javel, que pode ter feito com que os IJ's não se alimentassem o suficiente para ingerir a proteína. Essa hipótese pode ser confirmada pelo facto de os IJ's não terem avançado no seu desenvolvimento. O ensaio também terá de ser otimizado, visto que apesar de não se ter colocado *Photorhabdus luminescens* no meio os IJ de *Heterorhabditis bacteriophora* utilizados ao perderem a cutícula pelo tratamento com solução de Javel podem ter libertado para o meio a bactéria simbiote, que é capaz de produzir proteases que podem degradar a proteína de interesse.

Os ensaios de atividade, apesar de ainda preliminares, mostram claramente que o isolado L8D produz uma proteína de cristal que tem atividade nematicida. Este resultado indica que o gene identificado neste isolado, e que possui homologia com o gene *cry21*, é expresso e a proteína incluída no cristal. Em suma, é claro que estamos na presença de um gene codificante para proteína nematicida, o qual tem a capacidade de provocar mortalidade em nematodes. Uma vez que esta proteína pode ser eficaz no tratamento de infecções provocadas por parasitoides em humanos, é fundamental

avancar na caracterização e purificação desta proteína e testar a sua atividade com a realização de bioensaios sobre nematodes parasitoides de humanos e calcular LD<sub>50</sub>.

## Considerações Finais

Em suma, os resultados demonstram que estamos na presença de genes codificantes para proteínas citotóxicas com atividade sobre células cancerígenas com elevado interesse para a terapêutica do cancro (Cohen *et al.*; 2007). Já a proteína com atividade nematicida, pela primeira vez identificada em Bt's dos Açores, desperta grande interesse devido à sua capacidade de provocar mortalidade em nematodes causadores de infecções em humanos (Iatsenko *et al.*, 2014; Okassov *et al.*, 2015). O ensaio realizado demonstrou mortalidade apenas quando aplicado tratamento com cristais do isolado L8D, pelo que desperta interesse na continuidade do seu estudo. Os resultados estão de acordo com a bibliografia, onde a proteína Cry21 é abordada como promissora na área da saúde, podendo combater as infecções provocadas por nematodes em humanos, nomeadamente crianças e grávidas nos países em desenvolvimento (Iatsenko *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2007). Desse modo, torna-se fundamental avançar os estudos com esta proteína, purificando e caracterizando-a. Devemos converter a sequência de nucleótidos para aminoácidos de modo a perceber se nos encontramos na presença de uma nova subfamília de proteínas Cry21. Os ensaios de atividade devem ser otimizados de modo a calcular LD<sub>50</sub>.

## Bibliografia

Bobrowski, V. L.; Fiúza, L. M.; Pasqual, G.; Bodanese-Zanettini, M. H.; Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas; *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, 2003.

Bravo, A.; Gill, S.S.; Soberón, M.; Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control; National Institute of Health; *Toxicon.*; Vol. 49(4): pp. 423–435; 2008.

Bravo, A.; Likitvivatanavong, S.; Gill, S.S.; Soberón, M.; *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide; National Institute of Health; *Insect Biochem Mol Biol*; vol. 41(7): pp. 423–431; 2013.

Cohen, S.; Cahan, R.; Ben-Dov, E.; Nisnevitch, M.; Zaritsky, A.; Firer, M. A.; Specific Targeting to Murine Myeloma Cells of Cyt1Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*; The American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc; *The Journal of Biological Chemistry*; Published as Manuscript M703567200; 2007.

Costa, M. L. M.; Lana, U. G. P.; Barros, E. C.; Paiva, L. V.; Valicente, F. H.; Molecular Characterization of *Bacillus thuringiensis* cyt Genes and Their Effect Against Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*; *Journal of Agricultural Science*, Vol. 6, Nº 7; 2014 .

Ekino, K.; Okumura, S.; Ishikawa, T.; Kitada, S.; Saitoh, H.; Akao, T.; Oka, T.; Nomura, Y.; Ohba, M.; Shin, T.; Mizuki, E.; Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain; *Toxins*; Nº6, pp. 1882-1895; ISSN 2072-6651; 2014.

Espino-Vázquez, A.; Gómez-Treviño, A.; Galán-Wong, L.; Pereyra-Alfárez, B.; Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains with cytotoxic activity against MOLT-4, a leukemia cell line; *Microbes in Applied Research*: pp. 147-151; 2012.

Gonçalves, J. F.; Laia, M. L. de; Barbosa, B. F. F.; Bergamasco, V. B.; Santos, J. M. dos; Costa, A. L. da; Lemos, M. V. F.; Cloning and Expression of a novel *cry* gene that is potentially active against nematodes; *African Journal of Microbiology Research*; Vol. 8 (10), pp. 1017-1025; 2015.

Gonzalez, E.; Granados, J. C.; Short, J. D.; Ammons, D. R.; Rampersad, J.; Parasporins from a Caribbean Island: Evidence for a Globally Dispersed *Bacillus thuringiensis* Strain; *Curr Microbiol*; DOI 10.1007/s00284-011-9905-5; 2011.

Guerchicoff, A.; Delécluse, A.; Rubinstein, C. P.; The *Bacillus thuringiensis* cyt Genes for Hemolytic Endotoxins Constitute a Gene Family; *Applied and Environmental Microbiology*; American Society of Microbiology; Vol. 67, nº 3, pp. 1090-1096; 2001.

Hu, Y.; Aroian, R. V.; Bacterial pore-forming proteins as anthelmintics; *Invert Neurosci*; Vol. 12, No. 1, pp. 37-41; doi:10.1007/s10158-012-0135-8; 2012.

Hu, Y.; Zhan, B.; Keegan, B.; Yiu, Y. Y.; Miller, M. M.; Jones, K.; Aroian, R. V.; Mechanistic and Single-Dose *In Vivo* Therapeutic Studies of Cry5B Anthelmintic Action against Hookworms; *PLOS Neglected Tropical Diseases* ; Vol. 6, Issue 11, e1900; 2012.

Iatsenko, I.; Boichenko, I.; Sommer, R. J.; *Bacillus thuringiensis* DB27 produces Two Novel Protoxins, Cry21Fa1 and Cry21Ha1, Which Act Synergistically against Nematodes; *Applied and Environmental Microbiology*; Vol. 80, nº 10, pp. 3266-3275; 2014.

Iatsenko, I.; Nikolov, A.; Sommer, R. J.; Identification of Distinct *Bacillus thuringiensis* 4A4 Nematicidal Factors Using the Model Nematodes *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*; *Toxins*; 6:2050-2063; ISSN 2072-6651; 2014.

Ito, A.; Sasaguri, Y.; Kitada, S.; Kusaka, Y.; Kuwano, K.; Masutomi, K.; Mizuki, E.; Akao, T.; Ohba, M.; A *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells; *The Journal Of Biological Chemistry*; Vol. 279, No. 20; pp. 21282–21286; 2014.

Jisha, V. N.; Smitha, R. B.; Benjamin, S.; An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis* ; *Advances in Microbiology*; Vol. 3, 462-472; 2013.

Jouzani, G. S.; Seifinejad, A.; Saeedizadeh, A.; Nazarian, A.; Yousefloo, M.; Soheilvand, S.; Mousivand, M.; Jahangiri, R.; Yazdani, M.; Amiri, R. M.; Akbari, S.; Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus*

*thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes; *Can. J. Microbiol.*; Vol. 58, pp. 812-822; 2008.

Kitada, S.; Abe, Y.; Ito, A.; Kuge, O.; Akao, T.; Mizuki, E.; Ohba, M.; Molecular Identification and Cytocidal Action of Parasporin , a Protein Group of Novel Crystal Toxins Targeting Human Cancer Cells; *6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its Environmental Impact*, Victoria BC, 2005.

Kitada, S.; Abe, Y.; Maeda, T.; Shimada, H.; Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytocidal action to human hepatoma cells; *Toxicology*; doi:10.1016/j.tox.2009.07.016; 2009.

Lenina, N. K.; Naveenkumar, A.; Sozhavendan, E.; Balakrishnan, N.; Balasubramani, V.; Udayasuriyan, V.; Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*; *Biotechnology*; 4:545-551; 2014.

Leyns, F.; Borgonie, G.; Arnaut, G.; Waele, D. de; Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates; *Fundam. appl. Nematol.*; Vol. 18, nº 3; pp. 211-218; 1995.

Mendoza, G.; Portillo, A.; Árias, A.; Ribas, R. M.; Olmos, J.; New combinations of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico; *International Microbiology*; Vol. 15:209-216; 2012.

Montiel, R.; Nascimento, G.; Ferreira, R.; Recolha de amostras de solo nas ilhas do Pico e Faial para isolamento de bactérias e nematodes entomopatogénicos; *Rel. Com. Dep. Biol.*; 34:51; 2005.

Nomura, Y.; Ohba, M.; Shin, T.; Mizuki, E.; Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain; *Toxins*; Vol. 6; 1882-1895; ISSN 2072-6651; 2014.

Ohba, M.; Mizuki, E.; Uemori, A.; Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*; *Anticancer Research*; Vol. 29; pp. 427-434; 2009.

Okassov, A.; Nersesyan, A.; Kitada, S.; Ilin, A.; Parasporins as new natural anticancer agents: a review; *JBUON*; Vol. 20, Nº 1, pp. 5-6; ISSN: 1107-0625; 2015.

Okumura, S.; Akao, T.; Higuchi, K.; Saitoh, H.; Mizuki, E.; Ohba, M.; Inouye, K.; *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* strain 89-T-34-22 produces multiple

cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells; *Letters in Applied Microbiology*; Vol. 39; pp. 89-92; 2004.

Okumura, S.; Ishikawa, T.; Saitoh, H.; Akao, T.; Mizuki, E.; Identification of a second cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470; *Biotechnol Lett*; 35:1889-1894; 2013.

Okumura, S.; Koga, H.; Inouye, K.; Mizuki, E.; Toxicity of Parasporin-4 and Health Effects of Pro-parasporin-4 Diet in Mice; *Toxins*; Vol. 6; 2115-2126; ISSN 2072-6651; 2014.

Palma, L.; Muñoz, D.; Berry, C.; Murillo, J.; Caballero, P.; *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity; *Toxins*; Vol. 6, 3296-3325; 2014

Roh, J. Y.; Choi, J. Y.; Li, M. S.; Jin, B. R.; Je, Y. .; *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control ; *Journal of Microbiology and Biothechnology*; Vol. 17(4), 547–559; 2007.

Saitoh, H.; Okumura, S.; Ishikawa, T.; Akao, T.; Mizuki, E.; Ohba, M; Investigation of a Novel *Bacillus thuringiensis* genes Encoding a Parasporal Protein, Parasporin-4, That Preferentially Kills Human Leukemic T Cells; *Biosci. Biothechnol. Biochem.*; Vol. 70, nº 12, pp. 2935-2941; 2006.

Santiago-Alvarez, C.; Bullejos, C. E; Rosa, J. S.; Simões, N.; Aldebis, H. K.; Presence of *Bacillus thuringiensis* on Graciosa Island (Açores, Portugal); III Simpósio Fauna e Flora das Ilhas Atlânticas; pp. 21-25; 1998.

Soberón, M.; López-Díaz, J. A.; Bravo, A.; Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms; Peptides; Elsevier; 2012 (Disponível em ResearchGate).

Teixeira, M.; Teixeira, T.; Farrica, A.; Cabral, C.; Simões, N.; Oliveira, L.; Recolha de Amostras de Solo na ilha de São Jorge para Isolamento de Bactérias Entomopatogénicas; XV Expedição Científica do Departamento de Biologia - São Jorge 2011; *Rel. Com. Dep. Biol.* 40: 76; 2011.

Urban, J. F. Jr.; Hu, Y.; Miller, M. M.; Scheib, U.; Yiu, Y. Y.; Aroian, R. V.; *Bacillus thuringiensis*-derived Cry5B Has Potent Anthelmintic Activity against *Ascaris suum*; *PLOS Neglected Tropical Diseases*; Vol. 7, Issue 6, e2263; 2013.

Vidal-Quist, J. C.; Castañera, P.; González-Cabrera, J.; Simple and Rapid Method for PCR Characterization of Large *Bacillus thuringiensis* Strain Collections; *Curr Microbiol*; DOI 10.1007/s00284-008-9328-0; 2008.

Wang, y.; Mei, L.; Wu, J.; Zhang, L.; Detection and characterisation of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with nematicidal activity against the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*; *Biocontrol Science and Technology*; Vol. 22; No. 10; pp. 1143-1153; 2012 (Disponível em ResearchGate).

Wong, S. Y. R.; *Bacillus Thuringiensis* Parasporal Proteins and Their Effect On Human Cancer Cells: An Overview; *IeJSME*; 4 (2); pp. 3-9; 2010.

Wu, X.; Walker, M. J.; Hornitzky, M.; Chin, J.; Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance; *Journal of Microbiological Methods*; Vol. 64; pp. 107-119; 2006.

Xu, C.; Wang, B.; Yu, Z.; Sun, M.; Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins; *Toxins*; Vol. 6; 2732-2770; ISSN 2072-6651; 2014.

Yu, Z.; Xiong, J.; Zhou, Q.; Luo, H.; Hu, S.; Xia, L.; Sun, M.; Li, L.; Yu, Z.; *Journal of Invertebrate Pathology*; No. 125, pp. 73-80; 2015.

Zhang, F.; Peng, D.; Ye, X.; Yu, Z.; Hu, Z.; Ruan, L.; Sun, M.; *In Vitro* Uptake of 140 kDa *Bacillus thuringiensis* Nematicidal Crystal Proteins by the Second Stage Juvenile of *Meloidogyne hapla*; *PLoS ONE*; Vol. 7, Issue 6, e38534; 2012.

## Anexos

**Anexo I)** Informações dos isolados seleccionados para a pesquisa de genes codificantes para proteínas citotóxicas e nematicidas, sendo referida a ilha onde foi colhido o isolado, a morfologia e presença de cristal nos isolados seleccionados para a pesquisa de genes codificantes para proteínas citotóxicas. Legenda: (+), Presença de cristal; (-), isolados onde não se observou cristal, (+/-), isolados onde o cristal não se apresentava em todas as células.

Identificação	Ilha de Colheita	Morfologia	Presença de Cristal
S1A	S. Miguel	Esférico	+
S27B	S. Miguel	Esférico	+
S28B	S. Miguel	Esférico	+
S29C	S. Miguel	Esférico	+
S30E	S. Miguel	Esférico	+
S35E	S. Miguel	Esférico	+
S36B	S. Miguel	Esférico	+
S36D	S. Miguel	Esférico	+
S42D	S. Miguel	Esférico	+
S45B	S. Miguel	Esférico	+
S45E	S. Miguel	Esférico	+
S47D	S. Miguel	Esférico	+
S63C	S. Miguel	Esférico	+
S68C	S. Miguel	Esférico	+
S75D	S. Miguel	Esférico	+
S76C	S. Miguel	Amorfo	+
S77A	S. Miguel	Esférico	+
S78D	S. Miguel	Esférico	+
S78E2	S. Miguel	Esférico	+
S85E	S. Miguel	Esférico	+
S94E1	S. Miguel	Esférico	+
S99B	S. Miguel	Esférico	+
S102C2	S. Miguel	Amorfo	+
S103B	S. Miguel	Esférico	+
S103D-G	S. Miguel	Associado ao esporo	+
S104C2	S. Miguel	Esférico	+
S104D2	S. Miguel	Esférico	+
S108B2	S. Miguel	Esférico	+
S130A	S. Miguel	Esférico	+
S133B	S. Miguel	Esférico	+

S149B	S. Miguel	Amorfo	+
S150E	S. Miguel	Amorfo	+
S162D	S. Miguel	Esférico	+
S162E	S. Miguel	Esférico	+
S163E	S. Miguel	Esférico	+
S164B	S. Miguel	Esférico	+
S166E	S. Miguel	Esférico	+
S167A	S. Miguel	Esférico	+
S168A	S. Miguel	Amorfo	+
S170B	S. Miguel	Esférico	+
S171D	S. Miguel	Esférico	+
S175B	S. Miguel	Esférico	+
S175D	S. Miguel	Esférico	+
S176C	S. Miguel	Esférico	+
S176E	S. Miguel	Amorfo	+
S180A-Gut	S. Miguel	Amorfo	+
S181B-Hemo	S. Miguel	Amorfo	+
S215a	S. Miguel	Associado ao esporo	+
S216b	S. Miguel	Associado ao esporo	+
S218e	S. Miguel	Amorfo	+
S225d	S. Miguel	Amorfo	+
Bti 14T	Referência	Esférico	+
CR1e	Corvo	Esférico	+
CR7d	Corvo	Amorfo	+
CR10d	Corvo	Esférico	+
CR18c	Corvo	Esférico	+
CR24b	Corvo	Amorfo	+
FL1CB	Flores	Esférico	+
FL4EB1	Flores	Associado ao esporo	+
FL4EB11	Flores	Amorfo	+
FL4EC1	Flores	Associado ao esporo	+
L8D	Faial	Associado ao esporo	+
S7A	S. Miguel	Bipiramidal	+
S27D	S. Miguel	Esférico	+
S29E	S. Miguel	Esférico	+
S44D	S. Miguel	Bipiramidal	+
S45D	S. Miguel	Bipiramidal	+
S69E	S. Miguel	Bipiramidal	+
S98E	S. Miguel	Bipiramidal	+
S165B	S. Miguel	Bipiramidal	+

S218d	S. Miguel	Esférico	+/-
CR18b	Corvo	Esférico	+
CR23c	Corvo	Esférico	+
CR24D	Corvo	Esférico	+
FL7DC Ep2	Flores	Amorfo	+
S26E	S. Miguel	Amorfo	+/-
S54D	S. Miguel	Esférico	+/-
S148D	S. Miguel	Amorfo	+/-
S179B	S. Miguel	Amorfo	+/-
S195b	S. Miguel	Amorfo	+/-
S196a	S. Miguel	Esférico	+/-
S198d	S. Miguel	Amorfo	+/-
S91C	S. Miguel	Amorfo	-
S94E2	S. Miguel	Amorfo	-
S149A	S. Miguel	Amorfo	-
S149C	S. Miguel	Esférico	-
S213d	S. Miguel	Esférico	-

**Anexo II)** Sequências consenso obtidas pelo tratamento das sequências *foward* e *reverse* obtidas da sequenciação.

Isolado	Sequencia consenso (5'-3')
<b>S45B</b> (500pb)	TTTAAGGATACGCATACCGATATGACCCATCGCAATACCGTCATCTACTCCAATTGTATT AAATTCAAATGGAACCATGCCTGCTGCACGTACTGCTTCTTTAACAAGTTTCCCAAACCTC ATTTAAGTGCTTATGACCTGGAATAATTTCAATAAAAAGAATTACAAATTGCTATGAATGG TTTATCAAAATCTTCATCTTTTAAACCAGTTGCTTTTAATAAACTACGATGCGGAGCTTTA TCAAAACCTTTTTAATCATGTCACCTTCTCATCTTGTCAAAATCCCTTCTTACATATTTTTCA CTTATACTCTATTAATCTATTTCTTTACTAATTCTTTTCGGTGCATGAATCCAGCTCATCATT TCACGAAGCTCTGCTCCTACTTTTTCTAGCTGATGATTTTGTCTGCTTTTTTCATCGCACT ATACGCTGGACGCTTGGCTTGTAAGGAA
<b>S196 A</b> (1000pb)	TGCGTGCTTAATTTTCATTTTTATGAATTTGCGCCTCTGCTTTCTTAAAAAATCAACTTCT TCTGTTTCAGAAATCATTTTCGCTAATCTTTTCGCTTGTCTACAATTTTCGCTTTTCGTATA TACTTTCATCTATTATTTACCTCAATCGGTTCTCAACTAATTTCCCGTTAAGAGACCAA GTTTTTGCTTCCGTTATTTTTACTTTTACAAGCTGACCAATTAAGATTTTGAAGCGACGA AGTTTACAAGTTTATTCGTACGAGTATAACCTGCAAGTACTTCCGGATTATTTTTACTTTC CCCATCAACTAACACTTCTACAACCTTGACCTTTATAACGATTATTCTTTTCAACTGCCAAC CCATTACGAGTGTGTTAATCGTTGTAATCGTTCTTTCTTTACTTCCATAGGCACATTATC TTTCATTTTTGCGACTGGTGTACCTTCTCGCGGGGAATAAATAAATGTAATGCAGTATC AAATCCTACTTCACGATATAACGACATCGTTTCTTCAAATGCTCATCTGTTTCATTTGGG AAACCGACGATAATATCAGTTGTTAATACTGCGCTTGGAAATTGTTTCTTTAATTTTTCTTA CAAGTTCTAAATAATGTTACGTTGAATATTTACGTGCCATAATTTTCAACATATCTGTGCT TCCAGATTGAACTGGTAAGTGAATATGTTCCACTAGATTTCCACCTTTTCCAAGCACTTCA ATTAAGTGGTCATCGAAATCACGTGGATGACTCGTTGTAAAACGAATACGGGCAATATCA ACTTTACGAAGTTTCGTCATTAAATCGCCAAGACCGTATTCTAAATCTTCAAAGTCTTTAC CATATGCATTTACGTTCTGTCCAAGTAGCGTAATTTCTTTATAACCATTTCGACGCTAAATG ACGAATCTCTTGAATAATATCTTCTGGACGCCCTGCTTGTAAACCGCGCGCGCTTGTGT

	ATGCTATATGTGAATATCTATATCTCTCTGTCTCTGTACTGCATATAGTGATGTAGAT
<b>S198 D</b> (1000pb)	TGCGTGCTTAATTTCTTTTATGAATTTGCGCCTCTGCTTTCTTAAAAAATCAACTTCTTC TGTTTCAGAAATCATTTCGCTAATTCCTTCGCTTGTCTACAATTCGCTTTTCGTATATA CTTTCATCTATTATTTACCTCAATCGGTTCTCAACTAATCCCCGTTAAGAGACCAAGT TTTTGCTTCCGTTATTTTTACTTTCACAAGCTGACCAATTAAGATTGTAAGCGACGAAG TTTACAAGTTTATTCGTACGAGTATAACCTGCAAGTACTTCCGGATTATTTTTACTTTCCC CATCAACTAACACTTCTACAACCTTGACCTTTATAACGATTATTCTTTTCAACTGCCAACCC ATTACGAGTGTGTTAATCGTTGTAATCGTTCCTTTCTTTACTTCCATAGGCACATTATCTT TCATTTTTGCAGCTGGTGTACCTTCTCGCGGGGAATAAATAAATGTAAATGCAGTATCAA ATCCTACTTCACGATATAACGACATCGTTTCTCAAATTGCTCATCTGTTTCATTGGGAA ACCGACGATAATATCAGTTGTTAATACTGCGCTTGGAAATGTTTCTTTAATTTTTCTTACA AGTTCTAAATAATGTTACGTGAATATTTACGTGCCATAATTTTCAACATATCTGTGCTTC CAGATTGAACTGGTAAGTGAATATGTTCCACTAGATTTCACCTTTTCCAAGCACTTCAAT TAAGTGGCCATCGAAATCACGTGGATGACTCGCTGTAAAACGAATACGGGCAATATCAA CTTACGAAGTCCGTCATTAAATCGCCAAGACCGTATTCCACATCTTCCAAGCCTTTAAC CTACGCCTTCACGCTCCCTCCCACCCCC
<b>S175D</b> (300pb)	CGTACCGCCCGGCAAAAATTTTTTTGCGGCAATCGGGGCCAAAACCAACAAAAAAGG AAGAAATGGTGGKTATAAACCGGGTGTGGATGAAGTAAAAACATTTCAATAGATA AAACTGATGGGGAAARTTGAAGAAACGGTTTTTCCGGTTTAAAAAATGTKGGTTAAATT AAAACAAATTAGAACAAAAAAGAAATTACAAGGAAATATCCGGCAGGATAACTGG GTTAATAAGTTTGAAGGAGGAGTTAACAAAAAAGGTATTTGAAAAGGAAGACCTAA GACAAAGCCTGGGGTGGTTTGTTCATTTGGAAATTCGTTTGAAGTATTGATCCAACGAA CATTATGAAGTCATTAGGTGACGGAGATATGCTTGCTCTATTTTCTTTCTGTACTACAT GGTTTAGGTGTAGCAGCAATTGGTGAAAGACGAAGACCGGTTCTGCAATTTTACCAAG TG TAGTAAGATGCACAGCCTACGTAACGAACCAAGGTTAG
<b>S175D</b> (400pb)	TCACTATTTTGTCTCCATTTTGTCTCACGTTATTTATATAAAAAAGTTATGAAAATTCC ATAAAAATAATTATTCTAATAAACTTTATTTTGGATGCTAAAAAGCGCAAACCCCTGT GGTATAAGGGATTTGGCACTTTTATATTTTTATGTTTATCAAATGAACACCCTTAAAC TGCTCATTCTTTTCCCAAGATTCCACAATATAATGTGCAATCGTCGGGTTGAATCCTTTCC CAACTATAAAAAACATAATCGCAGCAACTTCTGTTAAAGCGTGTGTTGTGTGATGTATGTT TTGCTTCATTTAAACCGTAATCTACCCAAGTAATTAGTTTTACGAAATCTAGTACAGGTTT CTTTAATAGGTAAACAACTGTGTACCGACAACCTGCTGCATTTGTTGTTGAGTTGTTGT CTCCGAATTATGCTGGAATATT
<b>L8D</b> (500pb)	GGGAAGTTATTTTCTGTTTATTTTTGCGTAATCTACAAGACTTTGCCAGCGCTGTAATTCC TGCAAGAGGAATAGAAGCTGCTTCTTCGTAACATAATATTATTAGGCATATGTGATACTAA TTGATCTAATTGACTGCAATGTAATTCAGCATAAGAGCCGCTTCTATATTTTCAGGCAC TTTCGTAAACACTTTATCTCTATTATTGAAGCACTCTACATCTTCTCCAACTCTTCAATA ACTCCAGCTACATCTAATCCTAAAGTGATTGGAAATGAAAAGCGTAACCTGTTCTTGTAAG TCACCTTTTCTTATTTTCCAATCAACTGGATTAACAGATGTGTGCATGAATACGTATTAAT ACCTCATTATTCTTAAACAATCGGTTTTAAACTTGTCTTTCTTTAATTCTTCAACACTACC ATATTGATCAATAACAATTGCTTTGCATTTCTCTCTCCTGCTGTTGATGTGAGGGGTT AAGGATCAAAAATTT
<b>S133B</b> (500pb)	TCGTGTTGAGGATCCAATGAAATCAATAATCTCTTTCTATTAACGAAATTGATAATCC GAATTATATATTGCAAGCAATTATGTTAGCAAATGCATTTCAAATGCATTAGTTCCAC TTCTACAGATTTGGTGATGCCCTACGCTTTAGTATGGCAAAGGTTTAGAAATCGCAA CACAATTACACCGATGGGTGCTGTAGTGAGTTATGTTGATCAAATGTAACCTCAAACGAA TAACCAAGTAAGTGTTATGATTAATAAAGTCTTAGAAGTGTTAAAACTGTATTAGGAGT TGCATTAAGTGGATCTGTAATAGATCAATTAACCTGCAGCAGTTACAAATACGTTTACAAA TTAAATACTCAAAAAATGAAGCATGGATTTCTGGGGCAAGGAAACTGCTAATCAAA CAAATTACACATACAATGTCCTGTTGCAATCCAAAATGCCAAACTGGTGGCGTTATGT ATTGTGTACCAAAAACCA

<p><b>S133 B</b> (500pb)</p>	<p>CACCTTTTTAATTCTTTTTTTCAGAGCTATAGATCCACTTACCTTAAATTTCAATTTTGAAA AAGCTTTACAAATTGCAAATGGTCTTCCTAATGCAGGAGTTACAGGAACTATTAATCAAA GTGTAATTCATCAAACAATTGAAGTTTCAGTTATGATTAGTCAAATTAAGAAATTATTA GAAGTGTGCTAGGGCTCGTTATCAATAGTGCTAATTTTGGAACAGCGTAGTATCTGCTA TTACAAATACATTTACAAATTTAGAACCTCAAGTAGATGAAAATTGGATTGTTTGGCGTA ATTTATCAGCTACTCAAACAAGTTATTTTTATAAAATTTTATTTTCTATTCAAAATGAAGA TACAGGTAGATTTATGGCAATATTGCCTATAGCATTGAAATTACTGTGGATGT- CAAAAACAACAATTAT--ATCATT-CAAAA</p>
<p><b>L8D</b> (500pb)</p>	<p>CCCTCTTTTACGTAAAATGGTCAATCAAGCAAAGGCATTAATTCAAAAACGTAATTTACT TGTAATGGAGATTTTGGATCTTATAAGGGATGGTTATATGGTACGCTAGCAACTATATC TAATGATTCACCATTATTTAAATGTAACCTATTTATTATTAGAACAATTAATACACCAGTA TCATCATATGTTTATCAAAAAATAGAAGAATCACAGTTAAAACCATATACGCGTTATAAA GTTTCTGGTTTTATAGCAGAAAGTAAAGAATTAGAACTTGTTGTATCCCGATATGATAAA GAAATTTATAAGAAATTAATGTCCCATATGCAGATGCATTTCTTCTGATCCTA CTCCAAATTGTTGTCAATTAATTTATGTTTAAATGATAATTCAGATTCTCATTCTTTAGC TATAGTATTGATGTTGGTGCACA-----</p>