

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

INGRID DE SOUZA FREIRE

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE, CITOTOXIDADE E DA
HEMATOTOXICIDADE DO COMPLEXO ESPORO-CRISTAL DE
ESTIRPES RECOMBINANTES DE *Bacillus thuringiensis* EM
ORGANISMOS NÃO-ALVO

Brasília, março, 2012.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E DA
HEMATOTOXICIDADE DO COMPLEXO ESPORO-CRISTAL DE ESTIRPES
RECOMBINANTES DE *Bacillus thuringiensis* EM ORGANISMOS NÃO-ALVO

INGRID DE SOUZA FREIRE

**Orientador: Profº Dr. Cesar Koppe
Grisolia.**

**Coorientador: Profº Dr. Eduardo Cyrino
de Oliveira Filho.**

Dissertação apresentada ao curso de pós-
graduação em Patologia Molecular da UnB
como requisito para obtenção do título de
mestre.

Brasília, março, 2012.

INGRID DE SOUZA FREIRE

Título:

Avaliação da Genotoxicidade, Citotoxicidade e da Hematotoxicidade do Complexo Esporo-Cristal de Estirpes Recombinantes de *Bacillus thuringiensis* em Organismos Não-Alvo

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Patologia Molecular da UnB como requisito para obtenção do título de mestre.

Brasília

2012

*“Aos meus amados pais,
Roosevelt e Márcia Freire, e aos
meus avós, Moacir e Benedita
Souza, por me amarem acima de
tudo”.*

Dedico

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, UnB.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (Reuni), por proporcionar condições para o desenvolvimento do trabalho e pelo incentivo à pesquisa.

Ao meu chefe “mor” e orientador, Prof. Dr. Cesar Koope Grisolia. Agradeço-lhe por ser acima de tudo um grande amigo e paizão. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos na bancada, nos estudos, na sala de aula, no incentivo mental e físico, nas críticas, e; até mesmo nas discussões que tivemos, mais uma vez obrigada por ser essa pessoa maravilhosa.

Ao meu ex-chefe “mor” e coorientador, Prof. Dr. Eduardo Cyrino – Embrapa Cerrados, por incentivar-me desde a época da graduação, acreditar no meu potencial e proporcionar novas experiências acadêmicas. Talvez, se você não tivesse existido em meio a tudo isso, eu não estaria vivenciado mais esta etapa da vida.

À Dra. Rose Gomes Monnerat – Embrapa Cenargen, por proporcionar o material utilizado na pesquisa, assim como permitir a minha aprendizagem e permanência nas dependências do Laboratório de Bacteriologia, e à Érica Martins, por ser atenciosa, prestativa, motivadora e acessível com seus conhecimentos.

Agradeço à Prof. Dra. Ana Luisa Miranda Vilela, obrigada por tudo - pela análise estatística, pelos conhecimentos, pelas risadas e músicas sem som que dançamos juntas.

As minhas amigas e companheiras de dificuldade Letícia Gediél, Lilian Barbosa, Graciana Lordelo, Ieler, Daphne Muniz e Maria Luiza, agradeço pelos conhecimentos adquiridos, experiências juntas, risadas e momentos de tristeza. Deus foi infinito em sua bondade ao proporcionar estarem comigo nesta caminhada.

A todos aqueles do Departamento de Genética e Morfologia - UnB que de alguma forma estiveram presentes, seja ajudando-me no experimento ou dando apoio moral. São eles: Ana Luisa, Maria Luiza, Adriana, Lilian “baixa”, Bélin, Flávia Portilho “gatíssima”, Luciana Landim, a atriz global Mariana, Ieler, Paolin, Miguel, Johnny, Wânia e a linda da Graciana Lordelo.

Às meninas da Embrapa Cenargen pelos meses de cultivo e loucura que passamos juntas: Lunalva, Fernanda, Gabriela, Cristina, Alda, Edylaine.

Esse trabalho não teria sido o mesmo sem a ajuda de três mãezonas: Dr^a. Maria Luiza Fascinelli, Dr^a Érica Martins e Dr^a. Ana Luiza Miranda Vilela, não sei como descrever toda a ajuda que vocês me deram, toda a confiança e segurança que me passaram.

Aos meus pais, Roosevelt e Márcia Freire, os quais amo incondicionalmente. Pai, tu és meu maior ídolo, e mãe, meu amor por ti és tão grande que não há comparação!

Em especial, ao meu irmão, Armando Roosevelt, e aos meus avós, por me amarem incondicionalmente, apoiarem e proporcionarem o que estava ao seu alcance para que tudo desse certo.

Agradeço ainda à secretária da pós-graduação em Patologia Molecular, Jaqueline, por ter sido prestativa nos momentos que mais precisei, e ao Prof. Dr. Osmindo Junior, pelos conselhos e ajuda na pesquisa.

A todos os outros da minha família, distantes, mas tão amados. Meus avós, minha avó Iolanda e a minha tia Cidália Freire pela revisão ortográfica. Valeu tia!!

Aos demais amigos: Carol Gonzáles (obrigada por tudo Paraguaia), Mirene, Joayna, Carol Sávia, Thábata, Albaniza, Larissa Valente, Bruno Simões “lindo”, Lurrami Quenani, Thays Brito.

Também agradeço a minha prima quase irmã Luciane Ribeiro e a minha tia querida, Mônica, por serem tão prestativas, amigas, companheiras em todos os momentos, encobrendo minhas façanhas e me apoiando até nos momentos de loucura. Amo vocês.

Agradeço a Deus pela existência de todos vocês na minha vida.

RESUMO

Os esporos-cristais de *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm sido usados no controle biológico de insetos como uma alternativa para o uso de agrotóxicos na agricultura. As δ -endotoxinas, ou proteínas Cry do *B. thuringiensis*, possuem atividade inseticida para diferentes ordens de insetos. Mesmo como esporos-cristais, já apresentaram toxicidade e têm sido usadas para proteger diferentes culturas. Objetivou-se avaliar o potencial genotóxico, citotóxico e hematotóxico do complexo espora-cristal das estirpes recombinantes contendo os genes BtCry1Ia, BtCry10Aa e BtCry1Ba6 de *Bacillus thuringiensis*, em dois organismos não-alvo. Com esporos-cristais dessas estirpes recombinantes foram realizadas três concentrações/doses nos tratamentos com peixe e com camundongo, incluindo um grupo de controle negativo para ambos organismos. Grupos de 10 *Oreochromis niloticus*, foram expostos às concentrações de 25, 50 e 100 mg/L, que variaram de 10^7 a 9×10^7 esporos viáveis por mL por 96 horas. Grupos de 6 camundongos foram expostos via gavagem as concentrações de 27, 136 e 270 por 72 horas com variações de 4×10^8 a 10^{10} esporos viáveis. A genotoxicidade em peixes foi realizada por meio de três diferentes testes, o teste do cometa, micronúcleo e anomalias nucleares em eritrócitos periféricos corados com giemsa. A genotoxicidade em camundongos foi avaliada pelo teste do micronúcleo, a citotoxicidade através da proporção entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos, obtidos de sangue periférico e corados com laranja de acridina. A hematotoxicidade foi estudada por meio de hemograma completo. Nossos resultados mostraram que os esporos-cristais Cry1Ba6 e Cry10Aa não foram genotóxicos para peixes da espécie *O. niloticus*. Entretanto, o espora-cristal Cry1Ia induziu dano no DNA por meio do teste do cometa elevando o índice de danos moderados. Em camundongos, esses esporos-cristais não apresentaram genotoxicidade e citotoxicidade. No entanto, alguns dos parâmetros hematológicos foram significativamente alterados, o que parece estar relacionado com os níveis de exposição.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, bioinseticida, espora-cristal, genotoxicidade ambiental.

ABSTRACT

Spore-crystal of *Bacillus thuringiensis* have been widely used in the biological control of insects to replace chemical pesticides in the agriculture. The δ -endotoxins or cry proteins from *B. thuringiensis* have insecticide activity against several different orders of insects. Even as spore-crystal, they already show toxicity being used to protect many different crops. This study was carried out to evaluate the genotoxic, cytotoxic and haematotoxic potential of different recombinant strains of the complex spore-crystal BtCry1Ia, BtCry10Aa and BtCry1Ba6 from *B. thuringiensis* on two *in vivo* biological models. Groups of ten *Oreochromis niloticus* were exposed at concentrations of 25, 50 and 100 mg/L, which means a range from 10^7 up to 9×10^7 viable spores per ml of water for 96 h. Groups of six mice were exposed by gavage at concentrations of 27, 136 and 270 mg/kg for 72h, which means a range from 4×10^8 up to 10^{10} viable spores per ml of water. Genotoxic evaluations in fish were done using three different endpoints comet assay, micronucleus test and nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes stained by giemsa. Otherwise, the genotoxicity to mice was evaluated by micronucleus test and cytotoxicity through the relationship between polychromatic and normochromatic erythrocytes from peripheral blood stained by acridine orange. Haematotoxicity was studied through automated counter, considering erythrogram, leukogram and platelets from peripheral blood samples. Our results showed that spore-crystals Cry1Ba6 and Cry10Aa did not have genotoxicity to fish species *O. niloticus*. On the other hand, Cry1Ia induced DNA damage by the comet assay in some exposure levels. In mice, the three tested spore-crystals did not show genotoxicity nor cytotoxicity. However, some haematological parameters were significantly changed, which could be related to exposure levels.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, bioinsecticide, spore-crystal, environmental genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pulverização de agrotóxico de forma irregular.....	22
Figura 2: Pulverização de inseticida no combate a insetos vetores de doenças.....	23
Figura 3: Área global de produção de transgênicos de 1996 a 2008.....	29
Figura 4: Microscopia eletrônica de transmissão.....	32
Figura 5: Morfologia de <i>B. thuringiensis</i>	36
Figura 6: Micrografia eletrônica de varredura da estirpe de Bt S997.....	36
Figura 7: Toxicidade das proteínas Cry e Cyt.....	37
Figura 8: Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry.....	39
Figura 9: Representação da estrutura tridimensional das três toxinas Cry1Aa, Cry2Aa e Cry3Aa.....	40
Figura 10: Sítios de clivagem proteolítica de proteínas Cry.....	41
Figura 11: Receptores moleculares para proteínas Cry1A.....	42
Figura 12: Modelo de ação das toxinas Cry.....	43
Figura 13: Microscopia de contraste de fase de cristal e estrutura tridimensional (modelo teórico) de CryIIa.....	44
Figura 14: Micrografia eletrônica de varredura dos cristais da proteína Cry10A.....	45
Figura 15: Esporo-cristal e estrutura tridimensional de Cry1Ba6.....	46
Figura 16: Conservação das bactérias em tiras de papel-filtro.....	54
Figura 17: Diluição seriada para posterior plaqueamento.....	57
Figura 18: Colônias de <i>Bacillus thuringiensis</i>	58
Figura 19: <i>Oreochromis niloticus</i>	59
Figura 20: Exposição de tilápias a proteínas Cry.....	60

Figura 21: Níveis de fragmentação do DNA pelo teste do cometa.....	63
Figura 22: Porcentagem de danos moderados e elevados no DNA de <i>O. niloticus</i>	71
Figura 23: Níveis de fragmentação do DNA pelo teste do cometa.....	72
Figura 24: Frequência de micronúcleos e anomalias nucleares de <i>O. niloticus</i>	73
Figura 25: Micronúcleo e anomalia cromossômica em tilápias.....	74
Figura 26: Eritrócitos policromáticos e normocromáticos de camundongos corados com laranja de acridina.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: UFC das estirpes usadas no delineamento experimental com tilápias.....	68
Tabela 2: Mortalidade de tilápias expostas a esporos-cristais de Bt.....	69
Tabela 3: UFC das estirpes usadas no delineamento experimental com camundongos.....	75
Tabela 4: Resultados do teste de micronúcleo no sangue periférico de camundongos Swiss albinos.....	76
Tabela 5: Eritrograma de camundongos Swiss tratados com esporos-cristais.....	79
Tabela 6: Resultados do leucograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais.....	81
Tabela 7: Resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais.....	83

LISTA DE SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
AMCs	Agentes microbiológicos de controle
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Acridina Orange
APN	Aminopeptidase-N
ATP	Adenosina trifosfato
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CADR	Caderina
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cry	Proteínas cristais
CTNBio	Conselho Técnica Nacional de Biossegurança
Cyt	Proteínas citolisinas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENC	Eritrócito normocromático
EPC	Eritrócito policromático

FISH	Hibridização in situ fluorescente
g	Gramma
GCR	Glicoconjugado
GPI	Glicosilfosfatidil-inositol
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT	Hematócito
HGB	Hemoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
INC	Instrução Normativa Conjunta
L	Litro
mg	Micrograma
mL	Mililitro
MN	Micronúcleo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDW	Amplitude ou variação da distribuição do tamanho das plaquetas
P-LCR	Porcentagem de plaquetas gigantes
PLT	Plaquetas
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OGM	Organismo geneticamente modificado
RDC	Resolução Diretoria Colegiada
RDW	Amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos
RNA	Ácido ribonucléico

UFC	Unidade formadora de colônia
UNT	Unidades nefelométrica de turbidez
μL	Microlitro
VCM	Volume corpuscular médio
VPM	Volume plaquetário
v/v	volume/volume
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Mecanismos de controle de pragas agrícolas	20
1.1.1	Agrotóxicos	20
1.1.2	Controle biológico	23
1.1.3	Bioinseticidas	24
1.1.4	Plantas transgênicas	28
1.2	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	31
1.2.1	Histórico e isolamento	31
1.2.2	Características.....	33
1.2.3	Toxinas produzidas pelo <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
1.2.4	Nomenclatura.....	37
1.2.5	Estrutura das proteínas Cry.....	38
1.2.6	Mecanismo de ação	40
1.2.6.1	Solubilização	40
1.2.6.2	União ao receptor.....	41
1.2.6.3	Inserção na membrana, agregação e formação do poro.....	42
1.2.7	CryII.....	43
1.2.8	Cry10A	44
1.2.9	Cry1B	45
1.3	Teste do cometa.....	46
1.4	Teste da frequência de micronúcleos	47
1.5	Anormalidades nucleares.....	48
1.6	Teste de inibição da proliferação celular da medula óssea - citotoxicidade.....	48
1.7	Hematotoxicidade	49
1.8	Organismos aquáticos como indicadores de qualidade ambiental	50
2	OBJETIVOS	51

2.1	Objetivo geral.....	52
2.2	Objetivos específicos.....	52
3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1	Cultura vegetativa e crescimento bacteriano	54
3.2	Unidade formadora de colônia (UFC)	56
3.3	Conformidade segundo comitê de ética em pesquisa animal	58
3.4	Delineamento experimental com <i>Oreochromis niloticus</i> – tilápia do nilo	58
3.4.1	Procedimento de coleta.....	60
3.4.2	Frequência de micronúcleos e anomalias nucleares.....	61
3.4.3	Teste do cometa.....	61
3.5	Delineamento experimental com camundongos	64
3.5.1	Teste do micronúcleo e teste de proliferação celular.....	64
3.5.2	Hematologia.....	65
3.6	Análise estatística	65
4	RESULTADOS	67
4.1	Resultados <i>Oreochromis niloticus</i>	68
4.1.1	UFC das estirpes usadas em tilápias.....	68
4.1.2	Morbidade e mortalidade.....	68
4.1.3	Avaliação de diferentes parâmetros físico-químicos da água.....	69
4.1.4	Teste do cometa.....	69
4.1.5	Frequência de micronúcleos e anomalias nucleares.....	72
4.2	Resultados camundongos	75
4.2.1	UFC das estirpes usadas em camundongos.....	75
4.2.2	Teste do micronúcleo e teste de proliferação celular.....	75
4.2.3	Hemograma.....	78
4.2.3.1	Eritrograma.....	78
4.2.3.2	Leucograma.....	80
4.2.3.3	Plaquetograma.....	82

5	DISCUSSÃO	84
5.1	Peixes - <i>Oreochromis niloticus</i>	85
5.2	Camundongos	90
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mecanismos de controle de pragas agrícolas

1.1.1 Agrotóxicos

Os insetos praga são responsáveis por perda de aproximadamente 13% da safra de alimentos do mundo (Silva-Filho & Falco, 2000).

Na agricultura, as pragas diminuem a qualidade do produto para o mercado e consumo humano. No algodão, por exemplo, o comprimento e a força da fibra diminuem, na soja, raízes e caules são consumidos, e a desfolha também ocorre, e em outras situações, a Lagarta do Cartucho (*Spodoptera frugiperda*) perfura as folhas e ataca o cartucho do milho, diminuindo a massa da espiga e a produção dessa cultura em até 20% (Silva, 1999).

Os danos às culturas agrícolas e a rápida resposta no controle das pragas, requerida por agricultores, induzem ao uso de agrotóxicos, que por sua vez, possuem amplo espectro de ação, pouca especificidade a organismos alvo e causam uma série de danos à saúde humana.

A Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, vigora sobre agrotóxicos e afins definindo-os como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (Brasil, 1989).

A introdução de agrotóxicos no Brasil iniciou-se em meados de 1943, com as primeiras amostras de dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que foram descobertas em 1939 e tiveram ênfase no controle fitossanitário. A partir da década de 60, com o processo conhecido como “Revolução Verde” o modelo agrícola mundial baseado na utilização de defensivos agrícolas químicos foi introduzido nos países de terceiro mundo (Spadotto, 2006).

A partir de 1975, o próprio governo brasileiro criou financiamentos agrícolas para a aplicação de agrotóxicos em lavouras, com o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), onde aproximadamente 20% do incentivo agrícola eram obrigatoriamente destinados para a aquisição de agrotóxicos (Novato-Silva *et al.*, 2004).

Todavia, em 1962, nos Estados Unidos, a ambientalista Dra. Rachel Carson publicou o livro “Primavera Silenciosa” (*Silent Spring*), alertando sobre as consequências do uso

indiscriminado de tais produtos sobre populações de aves, e conseqüentemente o risco para o homem (Carvalho, 2006).

A cinética dos agrotóxicos no ambiente é determinada por processos de retenção (absorção), transformação (degradação química e biológica), transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial) e por interações desses processos (Spadotto, 2006).

O uso indiscriminado extensivo de agrotóxicos acarreta a degradação do meio ambiente por meio da contaminação do solo e da água. Tendo em vista a destruição da cobertura vegetal para efetuar o plantio, estes compostos químicos penetram o solo com mais facilidade podendo atingir o lençol freático e contaminar rios e lagos (Calheiros *et al.*, 2004).

A falta de previsão exata do comportamento desses químicos no meio ambiente, a interação entre eles (Oliveira-Filho, 2008), e a capacidade que eles possuem de se acumularem nos tecidos de organismos aquáticos, como pequenos crustáceos e peixes, que fazem parte da alimentação de comunidades ribeirinhas, são fatores preocupantes quando se trata de agrotóxicos.

Cerca de dois milhões de pessoas no mundo morrem anualmente em decorrência de compostos tóxicos na água, sendo a maioria crianças com menos de 5 anos de idade. Isto provém de poluentes emitidos por indústrias e pela agricultura, como compostos sintéticos, medicamentos e produtos de uso domissanitários. Desses poluentes, aproximadamente, 140 milhões de toneladas são provenientes de fertilizantes e pesticidas liberados na água (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Por exemplo, o herbicida atrazina que tem sido utilizado em larga escala no Brasil, principalmente na cultura de milho, foi proibido na Alemanha, devido aos altos níveis encontrados na água (0,5 µg/L - Europa), sendo que sua meia vida no solo varia de 1,5 mês a 5 anos (Traghetta *et al.*, 1996).

O mercado global investe cerca de US\$ 28 bilhões em defensivos agrícolas. No Brasil, este valor corresponde a US\$ 7 bilhões anualmente, sendo que 38,9% dos agrotóxicos são utilizados na Região Sul (Alves & Filho, 1998; ANVISA, 2009).

As publicações mais recentes da Organização Internacional do Trabalho/ Organização Mundial da Saúde (OIT/OMS) estimam que, entre trabalhadores de países em desenvolvimento, os agrotóxicos causam anualmente 70 mil intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito. E pelo menos sete milhões de doenças agudas e crônicas não-fatais, devido ao uso de pesticidas (Faria *et al.*, 2007). A figura 1 ilustra a realidade que abrange muitos trabalhadores de campo, a falta do uso de equipamentos de proteção individual.



Figura 1. Pulverização de agrotóxico de forma irregular.

Fonte: ANVISA, 2009b.

Vários estudos têm demonstrado em diferentes organismos que alguns agrotóxicos podem ser tóxicos e/ou genotóxicos e influenciar na sobrevivência, fertilidade e composição genética das populações (Krüger, 2009).

Estudos epidemiológicos em agricultores, aplicadores de inseticidas, e em indivíduos eventualmente expostos, revelaram aumento da incidência de câncer específico como leucemia, sarcoma de Ewing, linfoma de não-Hodgkin, cânceres no rim, cérebro, testicular, colorretal e câncer cerebral em crianças expostas em casa, ou que tenham pais em exposição ocupacional (Blair & Freeman, 2009). Os agrotóxicos podem também agir como desreguladores endócrinos, agindo na interação de receptores, inibindo a síntese de esteróides, e agindo diretamente sob o sistema endócrino (Mantovani *et al.*, 2008).

O fungicida sistêmico fenarimol que não é considerado genotóxico, ou de baixa genotoxicidade, mostrou-se genotóxico quando avaliado em fetos de ratos no início e no final da gestação (Castro, 2004). Em um trabalho realizado por Krüger (2009), verificou-se o aumento significativo de fragmentos cromossômicos, pontes, cromossomos retardatários e micronúcleos ocasionados pela ação do glifosato, beta-ciflutrina e fention, compostos utilizados em agrotóxicos.

Em ensaios utilizando o DDE, metabolito do DDT, verificou-se alta incidência de micronúcleos em cultura de linfócitos humanos numa concentração de 80mM (Ennaceur *et al.*, 2008).

No Brasil, ainda é comum, sobretudo em municípios pequenos, a pulverização de inseticidas em áreas residenciais para o controle de insetos vetores como o *Aedes aegypti*, vetor da dengue, conforme ilustrado na figura 2.



Figura 2. Pulverização de inseticida no combate a insetos vetores de doenças. Fonte: Ministério da Saúde, 2011.

Neste contexto, existem muitos dados na literatura científica que relatam a mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade de inseticidas, fungicidas e herbicidas químicos; todavia, há uma carência de dados sobre esses mesmos aspectos com relação aos biopesticidas. Com isso, faz-se necessária a geração de informações complementares nesta área de pesquisa toxicológica (Grisolia, 2005).

1.1.2 Controle biológico

Baseando-se no perfil toxicológico dos pesticidas e nos dados apresentados anteriormente, torna-se imprescindível uma alternativa sustentável, como o uso de produtos com alta especificidade aos organismos alvos e de menor efeito adverso.

A prática do controle biológico foi desenvolvida há séculos a partir da observação de produtores da ação de controle, principalmente, de predadores em insetos-praga, de fácil visualização e compreensão de seus ciclos de vida e de suas interações (Paula-Moraes & Oliveira, 2006).

As análises comportamentais de organismos controle tiveram ênfase no século XIX, incluindo a ação de entomopatógenos (fungos, bactérias, vírus, nematóides) que foi

impulsionada pela mortalidade do bicho-da-seda *Bombyx mori*, infectado pelo fungo *Beauveria bassiana*, comprovado cientificamente em 1835 (Paula-Moraes & Oliveira, 2006).

De acordo com Sujii e colaboradores (2002), o uso do controle biológico melhora a qualidade do produto, reduz a poluição ambiental e contribui para a preservação dos recursos naturais. Com isso, o controle biológico, que consiste no controle de pragas por meio da utilização de seus inimigos naturais, tem sido uma alternativa no controle de pragas agrícolas.

Na pecuária, por exemplo, o coleóptero *Digitonthophagus gazella*, vulgo “rola-bosta”, é usado no controle da mosca-do-chifre, um hematófago que parasita bovinos e outros animais. Essa praga provoca a diminuição da carne para o corte, a produção de leite, depreciação do couro e, às vezes, anemia. Os besouros são introduzidos no campo e se alimentam do esterco do gado, justamente onde a mosca faz a desova, o que consequentemente quebra o ciclo biológico da mosca (Brito *et al.*, 2007).

Todavia, o principal problema do controle biológico tem sido a introdução de espécies exóticas e a possibilidade delas competirem com espécies nativas, levando as espécies nativas a deslocarem-se para outros locais ou provocando sua extinção (Menezes, 2006).

O termo Agentes Microbiológicos de Controle (AMCs) foi criado e definido pela Resolução Diretoria Colegiada (RDC) nº 194, de 8 de julho de 2002, da ANVISA, para separar os microrganismos utilizados no controle de pragas agrícolas dos outros tipos de produtos biológicos (Oliveira-Filho, 2005). Os AMCs se destacam por possuírem maior especificidade aos organismos-alvo e, a princípio, por não apresentarem toxicidade a mamíferos.

1.1.3 Bioinseticidas

Segundo a Instrução Normativa Conjunta (INC) nº 3/2006 (Brasil, 2006a) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, ANVISA e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, agentes microbiológicos de controle são “os microrganismos vivos de ocorrência natural, bem como aqueles resultantes de técnicas que impliquem na introdução natural de material hereditário, excetuando-se os organismos cujo material genético (DNA/RNA) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética (OGM)”.

Os produtos biológicos também se enquadram na Lei 7.802/89, lei dos agrotóxicos e afins, e por isso, devem seguir o Decreto nº 4.074 de 2004 (Brasil, 2004) que regula a lei

citada. De acordo com o decreto e RDC nº 194/2002 (Oliveira-Filho, 2005), para que haja produção, manipulação, exportação, importação de agrotóxicos e afins, estes devem ser registrados e prestar informações e dados específicos dos produtos ao MAPA (produtos agrícolas), ANVISA (produtos agrícolas para uso em ambientes hídricos e desinfestantes domissanitários) e IBAMA (produtos agrícolas e para uso em ambientes hídricos).

A RDC nº124/2002 foi criada, sobretudo pelo fato de que tanto AMCs e agrotóxicos serem avaliados como produtos químicos, sem distinção sobre seu efeito sobre os diferentes ecossistemas. Ela preconiza estudos de toxicidade em AMCs que devem ser realizados, tendo em vista que pouco ainda se sabe sobre o verdadeiro potencial tóxico destes organismos (Oliveira-Filho, 2005).

A crescente procura por alimentos “mais limpos” e com baixa toxicidade e periculosidade tem aumentado a demanda comercial deles, e conseqüentemente, sua produção. Contudo, a preocupação dos órgãos reguladores desses produtos deve-se a similaridade entre os mecanismos de ação de produtos biológicos e produtos químicos, além do possível potencial adverso desses produtos sobre os alimentos e à saúde humana. Tal como a toxicidade de potenciais toxinas, dados de irritabilidade, alergenicidade e patogenicidade. Desta forma, se justificam os testes de segurança pelas agências reguladoras (Oliveira-Filho & Castro, 2006).

A INC nº 3/2006 (Brasil, 2006a) define ainda os principais estudos ecotoxicológicos solicitados: fase I – ensaios de toxicidade aguda para algas, invertebrados/peixes de água doce, insetos não-alvos, e toxicidade oral aguda para aves; fase II – estudos de comportamento desses agentes em diferentes ambientes; fase III – estudos de toxicidade em animais silvestres, patogenicidade e reprodução em aves, especificidade para invertebrados, ciclo biológico de peixes e plantas não-alvo. Ainda é prevista uma quarta fase, entretanto, as primeiras fases são as mais realizadas pelos interessados e em âmbito acadêmico, em virtude de maior praticidade dos testes. Os estudos envolvendo mamíferos também são exigidos pela ANVISA como subsídio para avaliação de perigos à saúde humana (Oliveira-Filho, 2008).

Os bioinseticidas, ou produtos biológicos entomopatogênicos, podem ser de origem fúngica, bacteriana ou viral. Eles são usados em vários países há quase 50 anos. Em geral, são inimigos naturais de pragas agrícolas e de vetores de doenças, como fungos e insetos. Na maioria dos casos, o efeito se dá pela presença de toxinas específicas que têm sua ação no trato digestório do inseto (Oliveira-Filho, 2008).

Considerando a ação benéfica dos bioinseticidas, a alta especificidade a organismos-alvos, o baixo ou nenhum efeito adverso no ambiente, e em espécies não-alvos, mamíferos,

aves e organismos aquáticos, além da possibilidade de ser usado em ação conjunta a outros mecanismos de controle, seu uso tem sido amplamente divulgado em campo, pela mídia, e inclusive, recomendado pela OMS em questões de saúde pública (Varella, 2011).

A conservação dos produtos à base de AMCs exige certos cuidados em decorrência de sua natureza biológica, pois alguns patógenos podem ter sua integridade comprometida devido à exposição ao calor, luminosidade, umidade e/ou contaminação por outros compostos. É de conhecimento científico que em algumas lavouras o equipamento usado para aplicação de bioinseticidas e agrotóxicos é o mesmo, podendo inviabilizar o uso do bioinseticida (Guimarães *et al.*, 2004).

Os bioinseticidas podem ser encontrados nas seguintes formas: pulverizáveis (concentrados emulsionáveis, suspensões concentradas, suspoemulsões, emulsões em água, pós molháveis, grânulos dispersíveis em água, suspensões encapsuladas, géis emulsificáveis), secas (pós, grânulos, iscas e fumigantes) e nas formas nebulizada, fumaça e tira plástica (Alves, 2006). A maioria dos produtores aplica inseticidas em formulações à base de água para controlar insetos-praga em baixos, médios e altos volumes de aplicação (Matthews, 1992).

Em campo, uma metodologia usada para medir o quanto do bioinseticida, ou mesmo de um composto químico, atinge a planta é o uso de papéis sensíveis a formulações misturadas à água, que são comercializados pela *Spraying Systems* do Brasil. A qualidade da aplicação é demonstrada pelo número de gotas por centímetro quadrado, sendo que para insetos-praga que atacam a parte aérea das plantas o mínimo deve estar entre 20 a 30 gotas por centímetro quadrado (Chaim *et al.*, 1999, Alves *et al.*, 2003).

O aumento da contaminação mundial de sistemas de água doce por compostos industriais, químicos e naturais é um dos principais problemas ambientais enfrentados pela humanidade. Embora a maioria deles esteja em baixas concentrações, levantam considerável preocupação toxicológica, particularmente quando são formados por misturas complexas (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

O uso de agroquímicos nas regiões de entorno dos sistemas de produção aquícola constitui uma ameaça para os organismos presentes nos mesmos e para a saúde do consumidor. Assim, tem-se incentivado o uso de produtos de menor risco a base de agentes biológicos de controle utilizados como biopesticidas (Jonsson *et al.*, 2009).

Os bioinseticidas mais utilizados no mundo e mais conhecidos, são aqueles à base da bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt), que foi primeiramente caracterizada em 1911 (Monnerat & Praça, 2006). O primeiro produto Bt, o Sporeine®, estava disponível na

França, em 1938, nos Estados Unidos, em 1957, e no Brasil, de acordo com o Sistema de Informação sobre Agrotóxicos (SIA), os primeiros registros datam de 1991 (Oliveira-Filho, 2008). Atualmente existem mais de 50.000 estirpes de Bt conhecidas, agindo sobre insetos de diferentes ordens, pragas da agricultura ou não (Batista *et al.*, 2005).

Vale salientar que alguns trabalhos têm relatados os efeitos posteriores dos bioinseticidas à base de Bt. Foi observada a persistência do pulverizado Bt *kurstaki* (Btk) em amostras de solo, assim como a resistência dos cristais em amostras de água, todavia, a sua presença neste segundo ecossistema não foi significativa (Douville *et al.*, 2006). Em 2008, pesquisadores da China publicaram um artigo relatando a presença de resíduos de Bt, como cristais, esporos-cristais e transgene, em alimentos como leite pasteurizado, sorvetes feitos de polpa de fruta e chá verde (Zhou *et al.*, 2008).

A percepção de transgenes de milho Bt já foi detectada em amostras de água próximas a essa cultura, assim como sua presença nos tecidos de mexilhões (Douville *et al.*, 2009). O uso da cepa 344 de *Bacillus thuringiensis*, utilizada numa concentração 1000 vezes maior do que a dose usada em campo provocou a mortalidade de peixes *H. scholzei*, reduziu a sobrevivência do microcrustáceo bioindicador *Daphnia similis*, todavia não afetou o crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Jonsson *et al.*, 2009).

Em contrapartida, o estudo de Marvier e colaboradores (2011) mostrou que a presença de invertebrados não-alvo foi maior em culturas Bt do que em culturas normais de milho e algodão, cujas plantações sofreram aplicações de inseticidas.

No uso de bioinseticidas bacterianos destaca-se ainda a bactéria *Bacillus sphaericus* (Bs), primeiramente relatada na década de 70, e com alta especificidade para larvas de mosquitos. Contudo, poucos estudos têm sido relatados a respeito da toxicidade desta bactéria, quando comparada à Bt (Oliveira-Filho, 2008).

Assim como o Bt, o *B. sphaericus* é uma bactéria entomopatogênica que produz mais de um tipo de proteína, toxinas-cristais e toxinas Mtx. Sendo que as toxinas MTX são proteínas não homologas às produzidas por Bt e que também produzem efeito citopatológico letal para larvas ao serem ativadas por receptores específicos (Silva *et al.*, 2002; Martins, 2008).

Embora o Bs tenha menor susceptibilidade a espécies de insetos quando comparado ao *Bacillus thuringiensis*, já se mostrou mais eficiente que este último quando usado no combate às espécies *Mansonia*, *Culex* e *Psorophora* (Boisvert & Boisvert, 2000).

Na tocante, outra bactéria que tem mostrado eficiência no controle de pragas agrônômicas, é o *Bacillus subtilis*, natural do solo assim como *B. thuringiensis*, podendo ser

encontrado como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR), bactérias epifíticas e endofíticas (Lanna-Filho *et al.*, 2010).

1.1.4 Plantas transgênicas

Com o uso indiscriminado de defensivos agrícolas químicos e o seu alto potencial tóxico ao homem, o surgimento dos bioinseticidas tornou-se mais seguro para devidos fins, em virtude de sua alta especificidade aos organismos alvos. Contudo, outra tecnologia tem sido implantada em campo - as plantas transgênicas - que podem ser resistentes a insetos, herbicidas, apresentando melhores valores nutricionais, tempo de amadurecimento e produtividade.

As plantas transgênicas no Brasil são reguladas pela Lei nº 11.105/2005 (Brasil, 2005a), que estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, devendo seguir também o Decreto 5.591/2005 (Brasil, 2005b) que regula a lei citada.

O Decreto 4.680/2003 estabelece o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078/1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis, devendo o consumidor ser informado da natureza transgênica deste produto, assim como da espécie doadora do gene exógeno (Brasil, 2003).

Organismos transformados geneticamente são aqueles que recebem genes exógenos, e por isso recebem o nome de transgênicos, e os genes inseridos são denominados de transgenes. Estes organismos também são chamados de organismos geneticamente modificados (OGMs). Portanto, vegetais transformados geneticamente são chamados de plantas transgênicas (Bespalhok-Filho *et al.*, 2001).

A principal técnica envolvida na produção de um transgênico é a transformação ou transfecção, onde ocorre a introdução de um DNA exógeno em uma célula alvo. A técnica pode ser utilizada de diferentes métodos como mediada por bactérias ou vírus com capacidade de transferência de material genético, por biobalística, eletroporação, que consiste na emissão de pulsos elétricos, ou na microinjeção. Sendo a biobalística e a microinjeção as mais conhecidas na transformação de plantas. Na transformação em animais, as técnicas mais

utilizadas são a microinjeção pronuclear e a injeção de células embrionárias (Andrade & Faleiro, 2011).

Na agricultura, o produtor pode ser beneficiado com o uso de plantas transgênicas principalmente pela diminuição do custo de produção e do uso de agrotóxicos. Plantas transformadas com resistência a insetos-pragas e doenças necessitam de menos aplicações de defensivos (Bespalhok-Filho *et al.*, 2001). Além do mais, a cultura de transgênico por possuir baixo custo de produção em campo, por diminuir o uso de inseticidas e a perda de safra, tornou-se economicamente viável para o país. Com menor custo de produção, o produto torna-se cada vez mais acessível para a população.

De acordo com James (2010), no ano de 2010, o Brasil foi o segundo país com maior área plantada com cultura de transgênicos, com uma estimativa de 25,4 milhões de hectares de área plantada com soja, milho e algodão. A nível global, os cultivares com resistência a herbicida são mais comuns, seguidos pelas plantas resistentes a herbicida e a insetos, e por último, os cultivares resistentes a insetos, conforme ilustra figura 3.

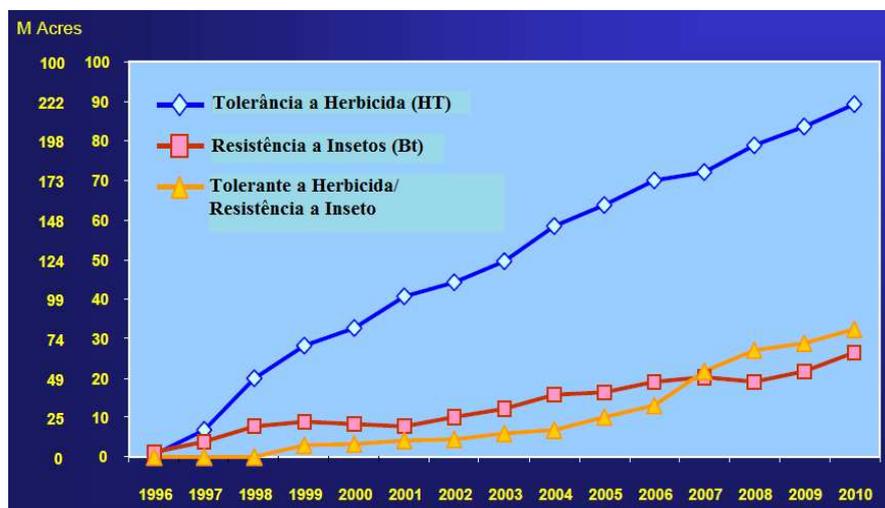


Figura 3. Área global de produção de transgênicos de 1996 a 2010 (James, 2010, com modificações).

No Brasil, o Decreto nº 5.950/2006 (Brasil, 2006b), estabelece as normas para o cultivo de transgênicos próximos à unidades de conservação, 500 m para plantio de soja resistente ao herbicida glifosato, 800 m para algodão resistente a insetos, 5000 m para este último plantio em caso de espécies silvestres na unidade. Sendo vedado o cultivo desses dentro de terras

indígenas e em unidades de conservação, com exceção das áreas de proteção ambiental (Brasil, 2006c).

A preocupação com transgênicos surgiu em meados da década de 70, com as primeiras construções de genes e a transferência de genes entre espécies diferentes (Jackson *et al.*, 1972; Andrade & Faleiro, 2011). A biossegurança envolve desde sua periculosidade ambiental, danos à populações não-alvo, assim como a transferência gênica horizontal e vertical que podem resultar em espécies de plantas com potencial desconhecido, como espécies selvagens invasoras. A preocupação dos possíveis impactos ambientais refere-se, sobretudo, a plantas com tecnologia Bt (resistência a insetos) e HT (resistência à herbicidas) (Andrade & Faleiro, 2011).

A fecundação cruzada entre cultivares transgênicos, ou entre um cultivar transgênicos e outro convencional, é uma preocupação adicional que tem sido mantida por grupos ambientalistas contra plantas transgênicas. Na verdade, a comunidade científica tem se dividido nesta questão (Chaimovich, 2003).

É colocado em pauta que alguns trabalhos já demonstraram a fecundação cruzada entre uma planta transgênica e uma normal, como é o caso já demonstrado na espécie *Brassica napus*, onde se obteve taxa de fecundação de 10^{-3} , a uma distância de um metro entre um plantio e outro, em campo e em casa de vegetação, e taxa de 10^{-5} nas distâncias de 16 e 32 metros (Pauk *et al.*, 1995). Em outros trabalhos ocorreu fecundação cruzada em plantio de girassol, na distância de 1000 metros (Arias & Rieseberg, 1994).

A colocação anterior implica no surgimento de uma nova espécie de planta que poderia competir com a planta convencional, ou mesmo com a transgênica, além de poder transferir genes ligados à resistência, por exemplo, fazendo com que esta nova espécie aja como uma planta daninha, e conseqüentemente, sendo mais difícil o seu manejo em campo.

Em contrapartida, tem a parte da comunidade científica que defende o uso dos transgênicos. Inúmeros fatores podem ser relatados a favor das plantações transgênicas, fora aqueles já enumerados anteriormente.

Sabe-se que a distância estabelecida entre um plantio e outro, além da alternância de cultivares para um mesmo terreno, pode dificultar o processo de fecundação cruzada e diminuir a acumulação dos produtos gerados pela planta e liberados para o solo.

Medidas como a criação de plantas transgênicas com machos estéreis, plantio em áreas geograficamente isoladas, construções de plantas com genes letais ativados por um agente químico ou pelo ambiente para evitar a dispersão de transgenes, transformação de organelas - mitocôndrias e cloroplastos (Handel *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2007).

De acordo com a CTNBIO, atualmente no Brasil existem quatro tipos de plantas transgênicas aceitas para o comércio: milho, soja, algodão e feijão, que podem ser resistentes à doenças, insetos, plantas daninhas e herbicidas.

Em plantas geneticamente modificadas, as mudanças fisiológicas que garantem a tolerância aos herbicidas podem afetar a biota associada, em virtude das alterações na qualidade dos exsudatos (Monquero, 2005).

Papa e colaboradores (2002) relatam que uma área com cultivar de soja resistente ao glifosato, na soja RR, pode apresentar espécies daninhas resistentes a este herbicida. Esse dado contradiz o uso da planta transgênica tendo em vista a necessidade de usar um herbicida químico para o controle das outras plantas que são resistentes. De acordo com outro estudo (Santos & Abreu, 2011), em lavouras com cultivares tolerantes ao glifosato, por exemplo, é aplicado herbicida químico após a emergência, a fim de eliminar possíveis plantas daninhas em meio ao cultivar transgênico, enquanto em culturas simples o uso do herbicida se faz duas vezes, antes da emergência e pós-emergência.

O fato mais preocupante nas culturas transgênicas é a natureza das substâncias implantadas nelas e seu potencial efeito sobre o solo, assim como o acúmulo delas no alimento e os possíveis efeitos sobre a saúde humana, como efeitos nutricionais e alergênicos.

1.2 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

1.2.1 Histórico e isolamento

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria aeróbia, gram positiva, da família Bacillaceae, que se apresenta em forma de bastonete, pertencente ao complexo *B. cereus*, que se caracteriza pela produção de inclusões proteicas cristalinas no momento de sua esporulação, conforme figura 4 (Glare & O'Callaghan, 1998; Monnerat & Praça, 2006). Esta bactéria possui duas fases durante o seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo na qual a bactéria se multiplica por bipartição; e outra de esporulação que consiste na diferenciação da bactéria em esporo (Monnerat & Praça, 2006). Quando o esporo se encontra no solo, ele não inicia o crescimento vegetativo, a não ser que se encontre em um ambiente propício, ou seja, rico em nutrientes (OECD, 2007; Martins, 2009).

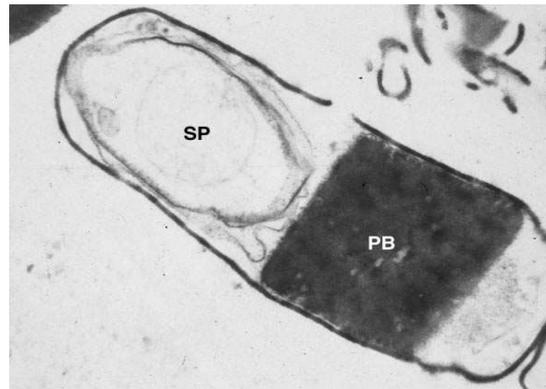


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão. Célula de *Bacillus thuringiensis* em esporulação, PB – corpo proteico e SP – esporo (De Maagd *et al.*, 2001).

Estas bactérias são consideradas ubíquas por serem isoladas de todas as partes do mundo e de diferentes ecossistemas e substratos como solo, água, folhas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Bravo *et al.*, 1998; Monnerat & Praça, 2006).

A primeira menção à doenças em insetos causada por Bt data de 1902, quando Ishiwata, no Japão, descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombix mori* e chamou-a de *Bacillus sotto*. Em 1911, Berliner, na Alemanha descreveu outra vez a mesma bactéria isolada de lagartas-da-traça da farinha *Anagasta kuhniella* e, em 1915, chamou-a de *Bacillus thuringiensis*, em homenagem à região de onde as lagartas foram coletadas (Whiteley & Schnepf, 1986; Dias, 1992).

Na década de 60, foi isolada uma estirpe de Bt subsp. *kurstaki*, chamada HD-1 (Dulmage, 1970) que apresentou toxicidade de 2 a 200 vezes superior as estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais (Monnerat & Praça, 2006). Em 1987 foi produzida a primeira planta transgênica Bt, o tabaco transgênico (Barton *et al.*, 1987). Desde então, com a finalidade de gerar métodos mais sustentáveis no combate a insetos-praga, cada vez mais novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* têm sido procuradas e isoladas.

De acordo com protocolo da OMS de 1985, o isolamento de diferentes espécies de *Bacillus* consiste em preparar as amostras (solo, água, insetos mortos) e submetê-las a choque térmico com a finalidade de matar células vegetativas mantendo apenas os esporos vivos. Consecutivamente, o material é crescido em meio de cultura e encaminhado para posterior caracterização (Monnerat & Praça, 2006).

1.2.2 Características

As toxinas de *B. thuringiensis* possuem atividade inseticida, contra um grande número de insetos-praga das ordens Hymenoptera, Hemiptera, Ortoptera, Coleoptera, Diptera e Lepidóptera, além de organismos que não são pragas agrícolas como os Nematodas, Protozoas, Trematodas, Acari (Bravo *et al.*, 1998; Kotze *et al.*, 2005; Erban *et al.*, 2009; Baloi *et al.*, 2011), e piolhos (Phthiraptera) (Hill & Pinnock, 1998).

A patogenicidade de Bt é atribuída às diferentes toxinas que ele produz e que também possuem atividade inseticida: δ -endotoxina, β -exotoxina, α -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Hansen & Salamitou, 2000). Todavia, de acordo com estudos de Johnson e McGaughey (1996), o esporo também pode contribuir para a patogenicidade uma vez que possui ação sinérgica com proteínas Cry.

Seu genoma tem cerca de 2,4 a 5,7 milhões de pares de base (bp) (Schnepf *et al.*, 1998). Existem aproximadamente 600 genes *cry* já identificados, agrupados em 224 grupos classificados em diferentes subgrupos, além de 8 grupos de toxinas Cyt. As proteínas Cry são agrupadas conforme a similaridade de sequência de seus aminoácidos. A atualização dos dados pode ser visualizada no endereço da Internet: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/ (Crickmore *et al.*, 2011). Entretanto, dados sobre a distribuição desses genes *cry* são limitados (Bravo *et al.*, 1998).

Uma das metodologias implantadas na caracterização de Bt foi a introdução do conceito “antígenos H” por De Barjac e Bonnefoi (1962), baseado em substâncias existentes no flagelo de bacilos entomopatogênicos. Este termo foi introduzido como elemento diferenciador de diferentes estirpes. E embora esse sistema de classificação seja confiável, não há correspondência entre o sorotipo e a atividade inseticida (Monnerat & Praça, 2006).

1.2.3 Toxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis*

Enterotoxinas

No homem as enterotoxinas estão mais relacionadas à diarreia e a outras infecções somáticas. Podem ser encontradas em alimentos contaminados, em amostras de ar e

superfícies (Soares *et al.*, 2008). Assumem duas formas: enterotoxinas hemolisina (HBL) e enterotoxina não-hemolítica (NHE).

HBL e NHE são formados por três componentes B, L₁ e L₂, correspondentes a primeira enterotoxina, e proteínas de massa molecular igual a 39, 45 e 105 kDa, correspondentes a segunda. Por meio de análise de PCR foi detectado a presença de genes de ambas as toxinas em variedades de *Bacillus thuringiensis*. As duas formas de enterotoxinas precisam da presença dos três componentes para que as atividades hemolíticas e citotóxicas sejam intensificadas (Hansen & Salamitou, 2000; Soares *et al.*, 2008).

α -exotoxina

Enzimas também conhecida como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfolipase, com atividade citolítica para fosfolípidos que constituem membranas celulares. É termolábil, solúvel em água e altamente tóxica a insetos quando ingerida via oral ou via intra-hemocélica, além de se apresentar tóxica para ratos e outros vertebrados, causando degeneração e lise de hemócitos (Martins, 2009; Mezzomo, 2010). Seu gene já foi clonado e sequenciado em *B. thuringiensis* e *B. cereus* (Hansen & Salamitou, 2000).

β -Exotoxina

A β -exotoxina ou thuringiensina é uma exotoxina termoestável, produzida durante a fase vegetativa da bactéria e liberada no meio de cultura. É produzida em grande quantidade pelo sorotipo H1 e em menor quantidade por cepas dos sorotipos H4a4b, H4a4c, H5, H9, H10, H11, H12 (Hansen & Salamitou, 2000; Monnerat & Praça, 2006).

Essa toxina se mostra de dois tipos. No tipo I ela é composta por adenina, ribose, glicose e ácido fosfolárico, análoga ao ATP e com massa molecular de 701 daltons (Da). Sabe-se que ela interfere na ação da RNA polimerase, agindo como competidor de ATP, além de desencadear efeitos teratogênicos e mutagênicos em invertebrados e vertebrados (Hansen & Salamitou, 2000; Martins, 2009). Por este motivo, na década de 70 os produtos comercializados à base de Bt linhagem H1 foram substituídos por outros de linhagens não produtoras de β -exotoxina (Monnerat & Praça, 2006).

A do tipo II é análoga ao UTP, produzida por cepas do sorotipo H8a8b (*morrisoni*) e mais tóxica do que as do tipo I, sobretudo para coleópteros. Os genes responsáveis pela sua síntese se encontram em plasmídeos de 75 a 110 MDa (Levinson *et al.*, 1990).

Proteínas vegetativas inseticidas - Vip3

As protoxinas Vip são proteínas produzidas durante a fase vegetativa e estacionária (Hansen & Salamitou, 2000). Possuem amplo espectro de ação, sobretudo para espécies de Lepidópteras, cujas proteínas Cry não se mostram muito efetivas (Monnerat & Praça, 2006). Foram exclusas da nomenclatura Cry por não formarem cristais proteicos. Elas provocam a paralisia e lise das células epiteliais do intestino médio da larva do inseto, lembrando as manifestações físicas das proteínas Cry (Martins, 2009).

Os genes que codificam as proteínas Vip estão presentes em plasmídeos de alta massa molecular, sintetizando uma proteína de 88 kDa, que podem ser Vip3A (a) e Vip3A(b) (Yu *et al.*, 1997).

Estas proteínas são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando, assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de Bt, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (Monnerat & Bravo, 2000; Martins, 2009).

δ -Endotoxina

As proteínas cristais (Cry) e proteínas citolisinas (Cyt) pertencem a uma classe de proteínas bacterianas conhecidas como toxinas formadoras de poros (TFP), que são solúveis em água, permitindo modificações conformacionais para permitir a inserção ou o translocamento destas proteínas na membrana celular do hospedeiro. Existem dois grupos de TFP: (1) α -hélice toxinas, no qual, a região de α -hélice forma um poro através da membrana e (2) β -barril toxinas, que se inserem na membrana formando um β -barril composto de monômero de grampos de folhas β -pregueadas (Parker & Feil, 2005 apud Bravo *et al.*, 2007).

As proteínas Cyt são de inclusão parasporal de atividade hemolítica (Bravo *et al.*, 2007), de ação inespecífica, possuem afinidade por ácidos graxos de cadeias insaturadas na porção lipídica da membrana celular e não possuem homologia com as proteínas Cry (Costa *et al.*, 2010; Mezzomo, 2010). Seu massa molecular varia de 25 a 28 kDa, contando com aproximadamente 8 grupos e 37 subgrupos (Crickmore *et al.*, 2011).

As inclusões proteicas cristalinas produzidas pelo Bt durante sua fase de esporulação são compostas por proteínas denominadas como Cry ou δ -endotoxinas (figuras 5 A e 5 B).

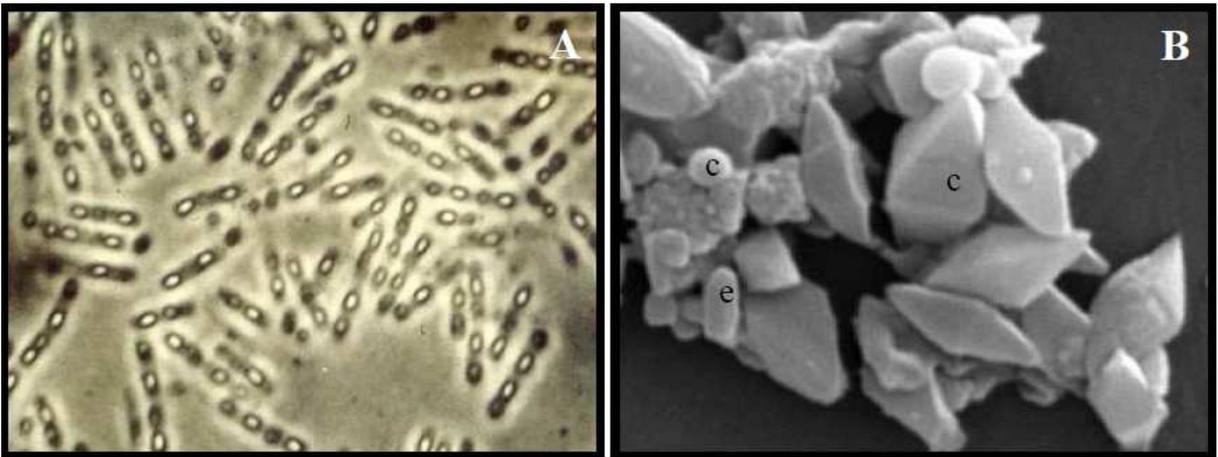
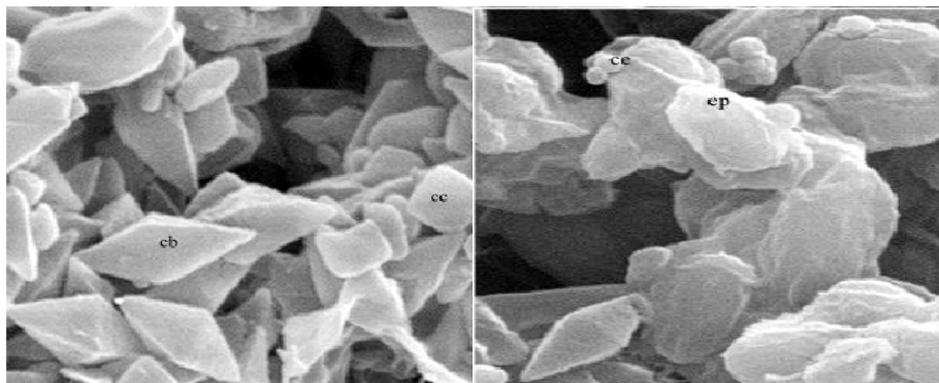


Figura 5. Morfologia de *B. thuringiensis*. A – Microscopia de contraste de fases (1.000X); B – Microscopia eletrônica de varredura, em “c” cristais, e em “e”, esporo (15.000X) (Martins, 2009).

As proteínas Cry apresentam cristais de massa molecular que variam de 14 a 152 kDa, suas estirpes podem apresentar um único gene codificador ou até mesmo cinco genes diferentes, como é o caso das subespécies *aizawai* HD-137 e *israelensis* IPS-82 (Monnerat & Praça, 2006). Estudos de cristalografia mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio de esporulação e liberados no momento da lise celular (Monnerat & Bravo, 2000). O cristal pode ser bipiramidal, cuboide, romboide, ovoide, esférico ou sem forma definida, conforme ilustrado na figura 6.



Figuras 6. Micrografia eletrônica de varredura da estirpe de Bt S997 (aumento de 10.000x). cb: cristal bipiramidal; cc: cristal cuboide; ce: cristal esférico; ep: esporo (Praça *et al.*, 2004).

As proteínas Cry são efetivas contra uma enorme lista de insetos de diferentes ordens, e as Cyt têm ação, principalmente, contra insetos da ordem Diptera (figura 7) (Bravo *et al.*, 2007).

		Coleoptera	Collembola	Diptera	Blattaria	Hemiptera	Hymenoptera	Isoptera	Lepidoptera	Neuroptera	Orthoptera	Siphonoptera	Thysanoptera	Echinostomida	Rhabditida	Cancer cells			Coleoptera	Collembola	Diptera	Blattaria	Hemiptera	Hymenoptera	Isoptera	Lepidoptera	Neuroptera	Siphonoptera	Thysanoptera	Echinostomida	Rhabditida	Cancer cells	
Cry 1A																		Cry 19B															
Cry 1B																		Cry 20A															
Cry 1C																		Cry 21A															
Cry 1D																		Cry 22A															
Cry 1E																		Cry 22B															
Cry 1F																		Cry 23A															
Cry 1G																		Cry 24B															
Cry 1H																		Cry 24C															
Cry 1I																		Cry 27A															
Cry 1J																		Cry 29A															
Cry 1K																		Cry 30A															
Cry 2A																		Cry 30B															
Cry 3A																		Cry 30C															
Cry 3B																		Cry 31A															
Cry 3C																		Cry 32A															
Cry 4A																		Cry 32B															
Cry 4B																		Cry 32C															
Cry 5A																		Cry 32D															
Cry 5B																		Cry 33A															
Cry 6A																		Cry 34A															
Cry 6B																		Cry 34B															
Cry 7A																		Cry 35A															
Cry 7B																		Cry 35B															
Cry 8A																		Cry 36A															
Cry 8B																		Cry 37A															
Cry 8C																		Cry 38A															
Cry 8D																		Cry 39A															
Cry 8E																		Cry 40A															
Cry 8F																		Cry 40B															
Cry 8G																		Cry 41A															
Cry 8A																		Cry 42A															
Cry 8B																		Cry 43A															
Cry 8C																		Cry 43B															
Cry 8D																		Cry 44A															
Cry 8E																		Cry 45A															
Cry 10A																		Cry 46A															
Cry 11A																		Cry 47A															
Cry 11B																		Cry 48A															
Cry 12A																		Cry 49A															
Cry 13A																		Cry 51A															
Cry 14A																		Cry 55A															
Cry 15A																		Cyt 1A															
Cry 16A																		Cyt 1B															
Cry 17A																		Cyt 2A															
Cry 18A																		Cyt 2B															
Cry 19A																		Cyt 2C															

Figura 7. Toxicidade das proteínas Cry e Cyt. ■ Toxina efetiva; □ não efetiva; ■ possivelmente efetiva; □ ou não testada (Frankenhuyzen, 2009).

Essas toxinas possuem alta especificidade a insetos alvos, são inócuas a humanos, vertebrados e plantas, e completamente degradadas (Bravo *et al.*, 2007).

1.2.4 Nomenclatura

Desde a clonagem e o sequenciamento do primeiro gene de proteína cristal, na década de 80 (Frankenhuyzen, 2009), muito se tem descoberto a respeito dessas proteínas, assim como o seu processo de nomenclatura.

O principal critério para a toxina ser incluída na nomenclatura “Cry” é ser uma proteína de inclusão parasporal e exibir atividade pesticida ou algum efeito tóxico para organismos-alvo (Crickmore *et al.*, 2011).

A classificação anterior agrupava as toxinas de acordo com a sua atividade tóxica para o organismo, então as tóxicas para lepidopteros eram separadas daquelas tóxicas para dipteros e coleopteros. Porém, essa classificação dificultava quando uma toxina era efetiva para mais de uma ordem (Crickmore *et al.*, 1998).

As δ -endotoxinas são apresentadas pelo nome da toxina seguido de números arábicos, por uma letra maiúscula, uma minúscula e números (Crickmore *et al.*, 1998; Mezzomo, 2010). Inicialmente, cada gene ou proteína recém caracterizada recebia uma designação de quem a descobriu, por exemplo, kurhd1; Bta; tipo B e C; icp; cry, atualmente, elas são agrupadas de acordo com a similaridade entre as suas sequências de aminoácidos (Crickmore *et al.*, 1998).

1.2.5 Estrutura das proteínas Cry

Sabe-se que as proteínas são mantidas juntas e estáveis na inclusão parasporal por meio de interações como hidrofobicidade, pontes de hidrogênio e de dissulfeto (Gill *et al.*, 1992). Essas pontes de dissulfeto, situadas na região C-terminal, estão relacionadas com a manutenção da estrutura, com a propriedade de solubilização dos cristais e com a conservação das sequências de aminoácidos nesta região, o que permite a agregação de diferentes proteínas no mesmo cristal (Martins, 2009).

As diferentes proteínas Cry possuem cinco regiões do genoma bem conservadas, o que sugere características evolutivas destas proteínas, assim como sua importância no mecanismo de ação dessas, uma vez que estas sequências em homologia se localizam nas regiões internas das proteínas e na região de contato entre domínios (Monnerat & Bravo, 2000; De Maagd *et al.*, 2001).

Na figura 8 se observa regiões de homologia entre os diferentes grupos da família destas toxinas. Sendo que o grupo I compartilha cinco blocos de homologia, no grupo II percebe-se homologia entre os blocos 1, 2, 4 e 5; e no grupo III apenas o bloco 1 possui homologia (De Maagd *et al.*, 2001; Martins, 2009). Conforme ilustrado, são perceptíveis regiões variantes e truncadas nos grupos apresentados.

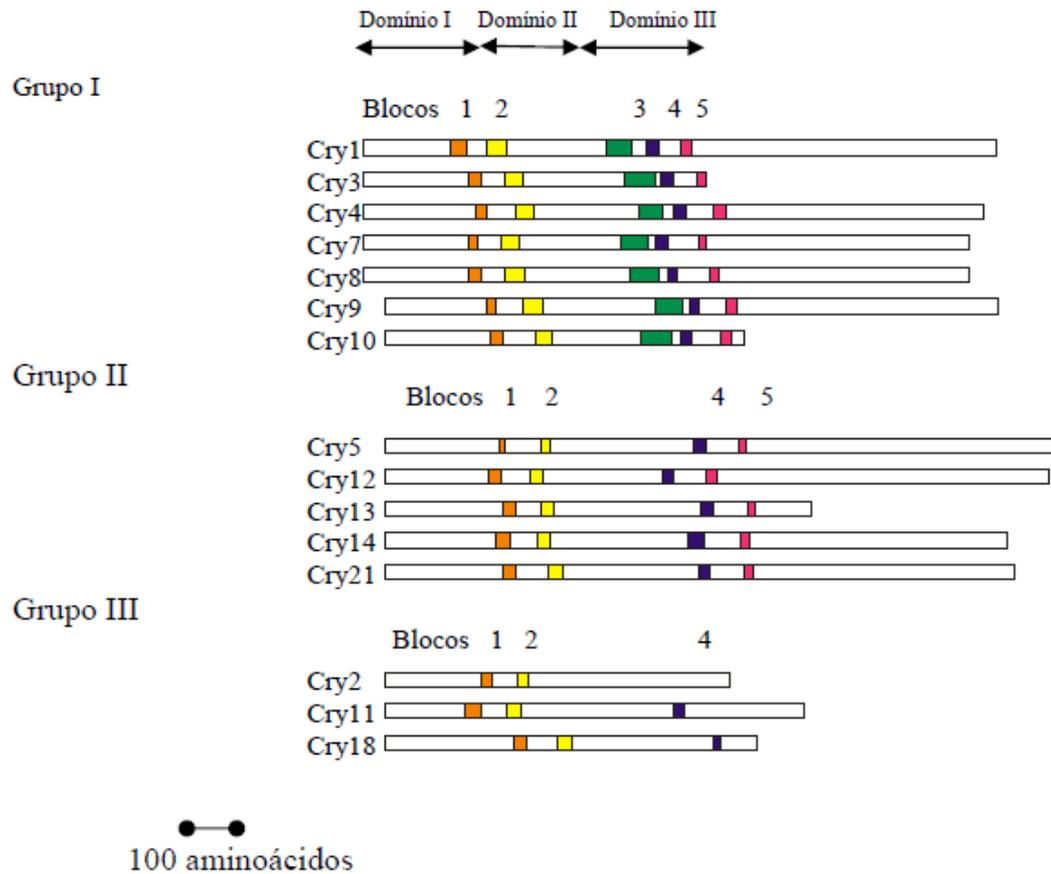


Figura 8. Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry. Os retângulos coloridos ilustram as sequências conservadas do genoma. Domínios I, II e III correspondem à toxina ativa (Martins, 2009).

Por meio de cristalografia de raios-X foi determinada a primeira estrutura molecular de uma proteína Cry (Cry3A) por Li e colaboradores (1991), o que facilitou a compreensão do modo de ação destas proteínas. A figura 9 ilustra a estrutura tridimensional das formas ativadas das proteínas cristais, que consistem em três domínios. O domínio I está relacionado à inserção na membrana e na formação do poro, o domínio II ao reconhecimento e ligação aos receptores de membrana, e o domínio III, à região C-terminal, que está possivelmente relacionada à estabilidade estrutural e à ligação ao receptor (De Maagd *et al.*, 2001; Martins, 2009).

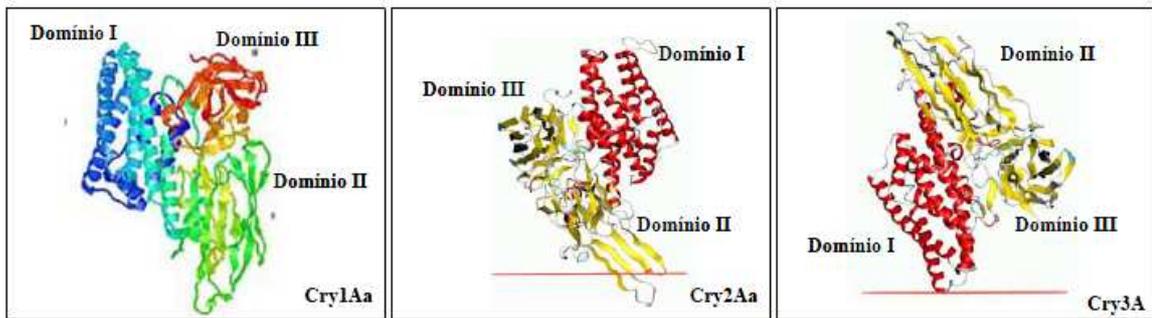


Figura 9. Representação da estrutura tridimensional das três toxinas Cry1Aa, Cry2Aa e Cry3Aa (Martins, 2009).

1.2.6 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação das proteínas Cry foi estudado principalmente em insetos da ordem Lepidoptera (Knowles & Dow, 1993; Bravo *et al.*, 2007). Elas se apresentam em forma de protoxinas e são solubilizadas em pH alcalino, acima de 9,5 (Knowles & Dow, 1993), no intestino médio da larva do inseto, todavia a proteína Cry3A, ativa para coleópteros, pode ser solubilizada em pH abaixo de 3,5 e acima de 9,5 (Martins, 2009). Os sintomas que se seguem com a ingestão desses cristais e proteínas são perda de apetite, rejeição ao alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e morte (Aronson *et al.*, 1986). As larvas infectadas apresentam mudança na coloração do tegumento, marrom-escuro, e após o óbito, elas apresentam cor negra, característica de infecções provocadas por Bt (Martins, 2009).

1.2.6.1 Solubilização

Essas proteínas cristais se solubilizam em pH alcalino, acima de 9,5. O que a torna viável no controle destes insetos-praga, tendo em vista que, de acordo Monnerat e Praça (2006) o intestino das maiorias das larvas suscetíveis a Bt tem pH elevado. Porém, a proteína Cry3A, que é ativa para larvas de crisomelídeos, é solubilizada em pH ácido, entre 3,5 a 4,2, e acima de 9,5, permanecendo inativa em pH neutro (Koller *et al.*, 1992). Neste caso, supõe-se que existam outros fatores no conteúdo intestinal delas, capazes de promover a solubilização destes cristais (Monnerat & Praça, 2006).

Posterior ativação por pH alcalino, estes cristais são clivados em regiões específicas (figura 10) pela ação de proteases, liberando um ou mais fragmentos tóxicos (Praça *et al.*, 2004; Martins, 2009).

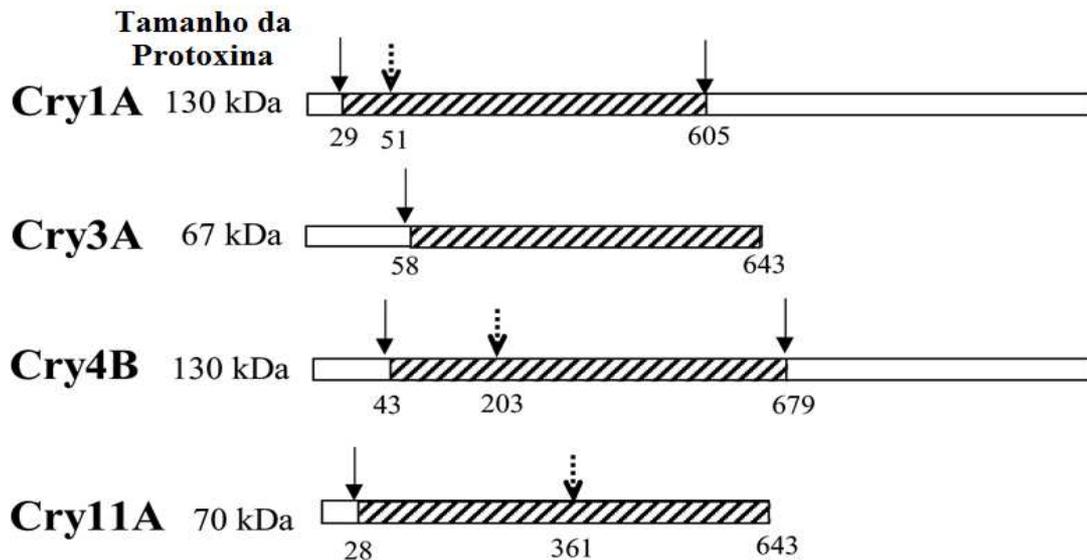


Figura 10. Sítios de clivagem proteolítica de proteínas Cry. As caixas brancas são protoxinas, e as listradas representam as toxinas ativas. As setas sólidas indicam os sítios de clivagem na porção N-terminal e C-terminal da toxina ativa. As setas listradas indicam clivagens intramoleculares da proteína ativa (modificado de Bravo *et al.*, 2007).

1.2.6.2 União ao receptor

Depois de ativados, os cristais atravessam a membrana peritrófica, se ligam a receptores específicos na microvilosidade das células colunares no intestino médio das larvas, interferindo no equilíbrio osmótico formando poros na membrana apical (Hofmann *et al.*, 1988; Mezzomo, 2010).

Essa união a esses sítios é a etapa determinante da alta especificidade destas proteínas cristais, por isso, vários grupos de pesquisa têm demonstrado interesse em entender como ocorre esse processo (Monnerat & Praça, 2006).

Sabe-se que a união dos cristais à membrana da microvilosidade do intestino médio da larva, é bifásica, composta de duas etapas, uma reversível e outra irreversível. A primeira consiste na ligação da toxina ao seu sítio de ligação, entretanto, isto não se confere toxicidade

efetiva, na irreversível, ocorre à união proteína-proteína, ou a seus receptores específicos, que parece estar mais ligada à atividade tóxica desta toxina (Van Rie *et al.*, 1990; Schnepf *et al.*, 1998).

Já foram identificados quatro receptores proteicos para as proteínas Cry nas microvilosidades da membrana apical. A primeira é uma proteína do tipo caderina (CADR), uma aminopeptidase-N (APN) e uma fosfatase alcalina (ALP), ambas ancoradas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), e um glicoconjugado (GCR), conforme ilustra a figura 11 (Bravo *et al.*, 2007).

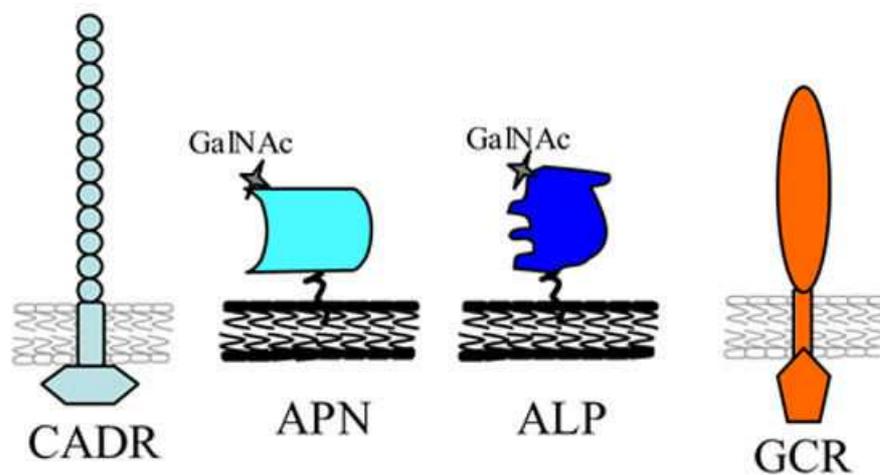


Figura 11. Receptores moleculares para proteínas Cry1A. CADR – caderina; APN – aminopeptidase-N; ALP – fosfatase alcalina; GCR – glicoconjugado (Bravo *et al.*, 2007).

Contudo, alguns trabalhos têm demonstrado que outros glicolípídeos podem estar envolvidos como moléculas receptoras para outros insetos e nematóides (Martins, 2009).

1.2.6.3 Inserção na membrana, agregação e formação do poro

Depois de ligar-se a receptores específicos à toxina se une rapidamente de forma irreversível à membrana plasmática das células epiteliais com posterior formação dos poros, que variam de 1 a 2 nm, e ocasionando um desequilíbrio osmótico, permitindo assim a maior

permeabilidade e extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocele do animal, levando a morte por inanição e septicemia (figura 12) (Van Rie *et al.*, 1990; Monnerat & Bravo, 2000).

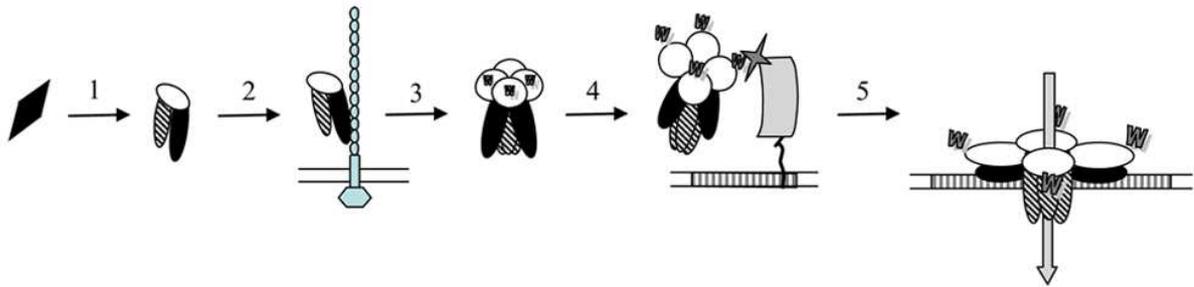


Figura 12. Modelo de ação das toxinas Cry. 1- solubilização e ativação da protoxina; 2- ligação da toxina monomérica com CADR ou GCR, mudança conformacional da toxina e clivagem da α -hélice 1; 3- formação oligomérica; 4- ligação com GPI-APN ou GPI-ALP; 5- inserção da estrutura na membrana e formação dos poros (Bravo *et al.*, 2007, com modificações).

De forma geral, existe um consenso sobre os passos iniciais da ligação dos monômeros de toxinas Cry aos receptores intestinais dos insetos (Martins, 2009). Porém, atualmente existem vários modelos que explicam a inserção das toxinas às membranas, sendo que esses modelos variam quanto a toxicidade consequente da ligação aos receptores, e quanto ao verdadeiro mecanismo de ação destas proteínas aos se ligar nos devidos receptores (Zhang *et al.*, 2005; Pigott & Ellar, 2007; Bravo *et al.*, 2007).

1.2.7 CryII

O gene para a proteína CryIIa foi primeiramente descrito por Tailor e colaboradores em 1992, e era definido como *cryV* (Crickmore *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2011). Este gene codifica uma proteína de 81 kDa e tem 62% de homologia ao gene da proteínas Cry1Ba (Martins *et al.*, 2008), além de ser efetivo para larvas de coleoptera e lepidoptera (Tailor *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2011).

A proteína CryIIa normalmente não se cristaliza, pois se trata de uma proteína que é secretada (Martins, 2009). Esta classe de genes, obtidas de *B. thuringiensis serovar kurstaki*, tem características únicas, ela é silenciada em algumas cepas de Bt, todavia, pode ser expressa

em *Escherichia coli* (Guo *et al.*, 2011), isto se deve ao fato destes genes localizarem-se a jusante (*downstream*) de outros genes *cryI*, sendo que a sequência terminadora de *cryI* situa-se no intervalo entre os genes *cryI* e *cryII* (Shin *et al.*, 1995).

Em 2008, Martins e colaboradores, conseguiram que a proteína Cry1Ia expressa em células de inseto, usando um baculovírus recombinante, formasse cristais cuboide, conforme pode se ver na figura 13, que também ilustra um modelo teórico da estrutura terciária dessa proteína.

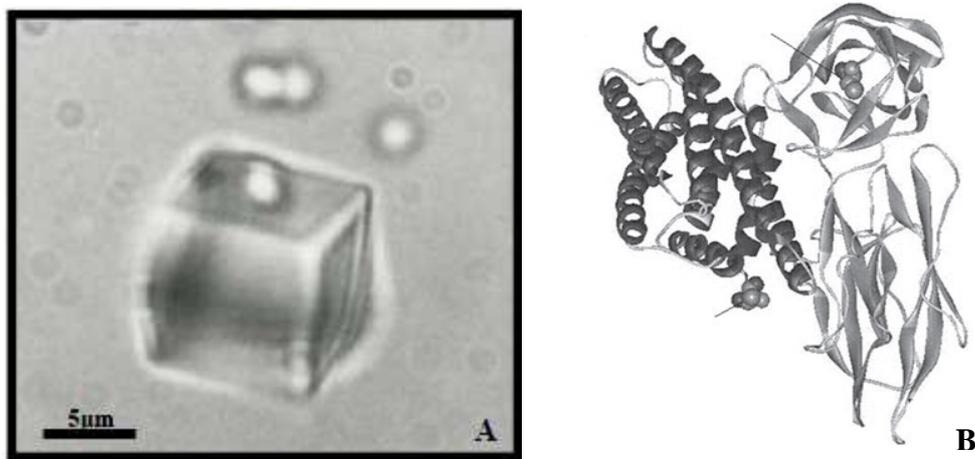


Figura 13. Em A, um cristal de forma cuboide de Cry1Ia, por microscopia de contraste de fase (Martins *et al.*, 2005), e em B, estrutura tridimensional (modelo teórico) dessa proteína, produzida por modelagem molecular por homologia a partir da δ -endotoxina Cry3A (Martins *et al.*, 2008).

1.2.8 Cry10A

A gene *cry10Aa* codifica uma protoxina de 78 kDa (figura 14), e sua atividade inseticida foi descrita por Thorne e colaboradores (1986). Este gene é encontrado em estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Aguiar, 2007; Gomez *et al.*, 2007; Carmona *et al.*, 2011), e era anteriormente designado como *cryIVC* (Crickmore *et al.*, 1998; OECD, 2007).

Acredita-se ainda que, o gene *cry10Aa* possui um ancestral em comum com o gene *cry4*, e em virtude de sua baixa atividade de expressão esta proteína tenha baixo poder tóxico

contra insetos (Hernandez-Soto *et al.*, 2009). Ela possui atividade inseticida contra insetos das ordens Díptera (Delecluse *et al.*, 1988; Frankenhuyzen, 2009), Lepidoptera (Vassal *et al.*, 1993;) e coleóptera (Aguiar, 2007), incluindo atividade nematocida (Aly, 2007).

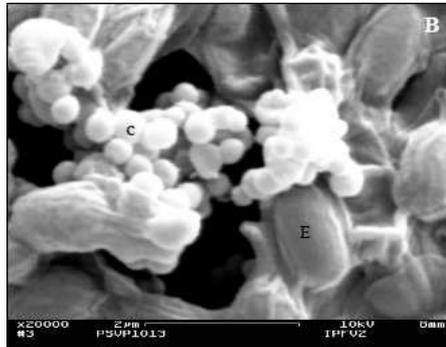


Figura 14. Micrografia eletrônica de varredura dos cristais da proteína Cry10A. E- esporos; C- cristais (Martins, 2009).

1.2.9 Cry1B

Sabe-se que a proteína Cry1B possui atividade inseticida contra insetos das ordens Lepidoptera (Breitler *et al.*, 2001; OECD, 2007), Coleoptera (Praça *et al.*, 2004; Frankenhuyzen, 2009, Martins, 2009) e Diptera (Frankenhuyzen, 2009).

Ela foi primeiramente descrita em 1988 por Bizzard e Whiteley, pode ser obtida de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 2011), e seu gene *cry1B* codifica uma proteína de 140 kDa (figura 15) (Espinasse *et al.*, 2002;). Esta proteína pode ser mais encontrada em cepas Bt aquáticas do que em terrestres (Martinez & Caballero, 2002).

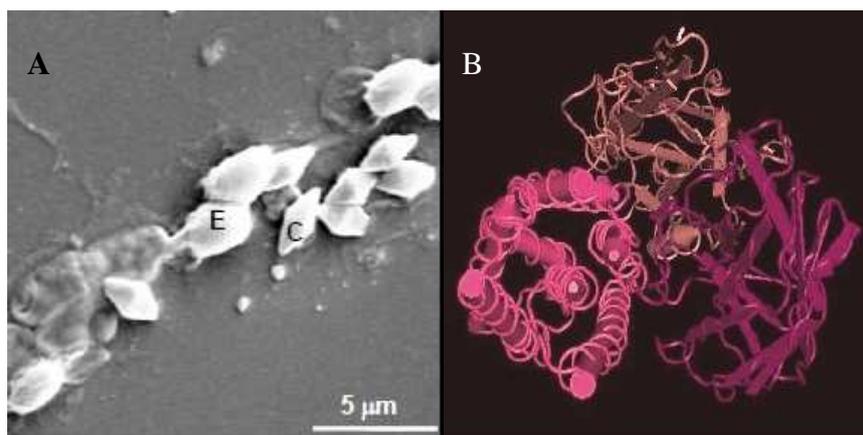


Figura 15. Em A, análise em microscopia eletrônica de varredura da mistura esporo/cristal, onde “e” é o esporo e “c” o cristal. Em B, predição da estrutura tridimensional da proteínas Cry1Ba6 (Martins, 2009, com adaptações).

1.3 Teste do cometa

O ensaio do cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*) é um teste de genotoxicidade que detecta fragmentações no DNA em células isoladas, por meio de uma eletroforese realizada em lâmina de microscópio. As células, com danos no DNA, são analisadas em microscópio de fluorescência onde são visualizadas em forma de cometa. O tamanho da cauda do cometa é proporcional ao índice de fragmentação no DNA. Este ensaio detecta lesões genômicas, que possam resultar em mutação, sendo passíveis de correção. Por meio deste ensaio é possível detectar quebras de fita simples e dupla, ligações cruzadas, sítios alcalilábeis e sítios incompletos de reparo. Ele consiste no rompimento da membrana, na extração das proteínas nucleares e na migração de fragmentos de DNA lesado (Gontijo & Tice, 2003).

Este método tem sido utilizado em inúmeros ensaios de avaliação da genotoxicidade e internacionalmente publicado por diferentes grupos de pesquisa (Speit & Schütz, 2008). Além do mais, ele é considerado indicador de genotoxicidade para diferentes organismos, alvos ou não, expostos a diferentes agentes, como metais pesados, pesticidas (Dhawan *et al.*, 2009), fármacos, monitoramento ambiental e de populações humanas (Speit & Hartmann, 2005).

Os danos acumulados nas células podem ser detectados pelos seguintes ensaios: PCR, Túnel, HPLC, FISH, ensaios imunológicos e imunohistoquímicos, por cromatografia entre

outros (Kumari *et al.*, 2008). Todavia, o ensaio do cometa apresenta vantagens como baixo custo e a requisição de células viáveis permitindo sua utilização a qualquer tipo de tecido (Gontijo & Tice, 2003).

O corante comumente usado neste ensaio é o brometo de etídio (EtBr), característico por corar ácido nucléico, ele se intercala entre as bases nitrogenadas de uma fita e outra (Matos *et al.*, 2007; Moreira, 2010), e ao ser exposto à luz UV, suas moléculas são excitadas emitindo energia através de luz perceptível, na cor vermelha ou alaranjada. Esse corante por se ligar aos nucleotídeos interfere na ação da DNA polimerase III, podendo alterar o quadro de leitura, e sendo por isso, considerado um agente altamente cancerígeno.

1.4 Teste da frequência de micronúcleos

Este ensaio é o mais utilizado para detectar a ação de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidias ou segregação cromossômica anormal). Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas em virtude de danos induzidos nas células parentais, podendo ser fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros. Esses micronúcleos se formam durante a telófase da mitose ou da meiose, e são provenientes de fragmentos, ou cromossomos inteiros, que não foram incorporados ao núcleo principal das células filhas após a divisão celular. Posteriormente, uma membrana se formará em volta deste fragmento, sendo visualizado como um pequeno núcleo (Ribeiro, 2003).

O teste do micronúcleo é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte dos testes de avaliação de toxicidade para registro de produtos químicos, farmacêuticos e aqueles usados no ambiente (Ribeiro, 2003; Mughal *et al.*, 2010; Vasquez, 2010), sendo citado inclusive em pareceres da ANVISA (2010a).

O teste do micronúcleo tem sido usado como método de avaliação de agentes genotóxicos ou carcinogênico para diferentes organismos como em estudos realizados em roedores (Grisolia, 2002; Çelik *et al.*, 2005; Benigni & Worth, 2010; Morita *et al.*, 2011) e em populações expostas a pesticidas ou não, como em trabalhos de cultivo de células humanas (Bolognesi *et al.*, 2011; Bull *et al.*, 2011; Fenech *et al.*, 2011). Em organismos aquáticos, bivalves e peixes, inúmeros estudos tem demonstrado a eficiência deste teste para análise

genotóxica (Bücker *et al.*, 2006; Bolognesi & Hayashi, 2011; Malla *et al.*, 2011), tornando-se um preconizador de poluição em recursos hídricos.

1.5 Anormalidades nucleares

A interferência de compostos tóxicos na integridade e funcionamento do DNA, além da formação de adutos de DNA e anomalias nucleares, vem sendo cada vez mais utilizada em estudos de biomonitoramento (Silva, 2008).

Alguns autores citam que a identificação de anomalias nucleares deve ser incluída nos estudos de genotoxicidade em peixes como um parâmetro a ser avaliado em conjunto com a presença de micronúcleos, dando um suporte a mais nesta metodologia (Ayllon & Garcia-Vazquez, 2000; Pretti *et al.*, 2007; Silva, 2008; Bolognesi *et al.*, 2011).

1.6 Teste de inibição da proliferação celular da medula óssea - citotoxicidade

O teste de proliferação de eritrócitos pela medula óssea tem sido usado comumente a fim de avaliar a toxicidade de agentes químicos ou não sobre a linhagem eritrocítica de animais e humanos (Pereira *et al.*, 2004).

Este estudo consiste na observação da presença ou não de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC), que representam danos recentes justamente por esses serem aqueles eritrócitos recém liberados pela medula óssea, que tem vida curta (Almeida, 2008). Os micronúcleos em eritrócitos normocromáticos (ENC), eritrócitos maduros, podem ser observados em sangue periférico, visto que baço de camundongo não sequestra do sangue eritrócitos micronucleados (Alves *et al.*, 2008).

Por meio deste ensaio percebe-se efeito agudo, sobre os eritrócitos policromáticos, e efeito crônico, onde são estudados ambos eritrócitos, poli e normocromáticos (Bueno & Agostini, 2001). Logo, a citotoxicidade ou depressão celular na medula óssea é indicada pela diminuição na proporção de eritrócitos imaturos (Almeida, 2008).

A utilização do corante fluorogênico ácidotrópico laranja de acridina ou “*acridine orange*” (AO) destaca-se pela fácil diferenciação entre um EPC e um ENC (Çavas, 2008). O AO cora DNA e RNA, atravessando a membrana plasmática e se intercalando entre as bases nitrogenadas de uma mesma fita, ao ser exposto a luz UV este corante emite luz de coloração

verde e laranja, ele também pode interagir com DNA por meio de interação eletrostática (Çavas, 2008).

Sob fluorescência distingue-se nitidamente se o laranja de acridina está ligado a DNA ou RNA. Quando está ligado ao DNA, ele emite cor amarelo esverdeada e quando ligada ao RNA, emite fluorescência de cor avermelhada (Çavas & Gözükar, 2005). Em células anucleadas, seu uso facilita a percepção de eritrócito policromático e normocromático, uma vez que os PCN ainda possuem em seu citoplasma grande quantidade de RNA, ele cora fortemente na cor alaranjada, e nos eritrócitos normocromáticos com poucos vestígios de RNA, ele cora em verde, com isso caso haja presença de micronúcleos esses serão perceptíveis em tais células.

1.7 Hematotoxicidade

A hematotoxicologia é definida como o estudo dos efeitos adversos dos compostos químicos, e outros agentes xenobióticos, sobre o sistema hematopoiético (Bloom & Brandt, 2008).

A medula óssea é considerada um importante órgão alvo de agentes xenobióticos, justamente por também ser constituída pelo sistema hematopoiético e contar com fatores de diferenciação celular para diferentes linhagens linfoides e mieloides (Bloom & Brandt, 2008). Este sistema pode sofrer alterações quando exposto à ação de fatores ou substâncias nocivas presentes no ambiente (Goldstein, 1998), tais como os hidrocarbonetos aromáticos, radiações ionizantes e agrotóxicos (Katz, 2007).

Tendo em vista que, algumas substâncias são capazes de induzir alterações hematológicas, tal como o benzeno que pode ser associado à doenças como a leucemia (Cronkite *et al.*, 1989), o formaldeído (Zhang *et al.*, 2010), e radioterápicos usados no tratamento do câncer (Ishizuka *et al.*, 2011), variações, especialmente a diminuição de certos tipos celulares no sangue periférico, podem estar relacionadas à anemias, trombocitopenias e leucopenias (Bloom & Brandt, 2008).

Neste contexto, as análises realizadas em amostras de sangue periférico, obtidas por meio de hemograma completo, podem mostrar a ocorrência de tais efeitos adversos sobre a medula óssea. Por isso, a hematotoxicidade é considerada um parâmetro primordial ao se estudar a viabilidade de medicamentos e outros compostos, sendo inclusive utilizada para

definir a dosagem de certos medicamentos em tratamentos terapêuticos, além de ser um fator determinante na segurança dos resultados obtidos (Bloom & Brandt, 2008).

1.8 Organismos aquáticos como indicadores de qualidade ambiental

Bivalves, pequenos crustáceos, moluscos e peixes são frequentemente usados em testes de avaliação toxicológica, sobretudo em ensaios de análise de água, sendo alguns utilizados como bioindicadores ambientais.

Peixes são considerados um bom modelo de estudo do potencial mutagênico e/ou carcinogênico de contaminantes presentes na água por metabolizarem, concentrarem e transmitirem por meio da água poluentes armazenados em seu organismo (Ali *et al.*, 2008).

O peixe *Oreochromis niloticus*, também conhecido como tilápia do nilo, é uma espécie exótica muito utilizada na aquicultura brasileira. Esta espécie tem capacidade de acumular determinadas toxinas em seus tecidos (Soares *et al.*, 2004), podendo conseqüentemente ocasionar risco à saúde humana, além de ser um excelente sistema para testes de toxicidade em ensaios laboratoriais (Riveiro, 2007).

O chamado “Clean Water Act” foi um marco regulatório na proteção da qualidade de água nos Estados Unidos, o que permitiu a implantação de programas de controle da poluição, incluindo padrões de qualidade de efluentes industriais (Magalhães & Filho, 2008).

Segundo resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Nº 430/2011, os efluentes lançados em corpos hídricos não deverão causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com critérios de ecotoxicologia estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

A piscicultura brasileira vem apresentando grande intensificação da produção nos últimos anos, tendo na tilápia do Nilo uma das principais espécies cultivadas (Carvalho, 2010). Em virtude desta crescente disponibilidade à população, torna-se útil sua utilização em ensaios toxicológicos.

Baseando-se no fato de que a poluição na água pode inferir diretamente na vida aquática (David *et al.*, 2008), faz-se necessário a utilização de organismos aquáticos na avaliação de compostos que possam estar presentes em lagos, rios, afetando ou não diferentes populações aquáticas.

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial genotóxico, citotóxico e hematotóxico do complexo esporo-cristal das estirpes recombinantes BtCry1Ia, BtCry10Aa e BtCry1Ba6 de *Bacillus thuringiensis* em dois organismos não-alvo, o peixe *Oreochromis niloticus* e o camundongo, *Mus musculus*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinação do perfil genotóxico por meio do teste do cometa em sangue periférico de peixes;
- Avaliação da genotoxicidade de esporos-cristais em organismo aquático por meio de análise de anormalidades nucleares e frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes;
- Identificação do efeito genotóxico decorrente da exposição a esporos-cristais de Bt em camundongos SWISS, por meio do teste de micronúcleo;
- Avaliar o potencial citotóxico em camundongos, através do teste de inibição da proliferação celular na medula óssea, analisando a proporção entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos;
- Verificação dos efeitos adversos sobre a hematopoiese de camundongos, por análise de hemograma completo.

3.1 Cultura vegetativa e crescimento bacteriano

As bactérias recombinantes utilizadas foram: BtCry1Ia (Martins *et al.*, 2008), BtCry1Ba6 (Martins, 2009) e BtCry10Aa (Martins, 2009) obtidas das estirpes S1811, S601 e S1806, respectivamente. Essas proteínas recombinantes já se mostraram tóxicas para larvas de *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), também conhecido como ‘bicudo do algodoeiro’.

Para a obtenção do esporo-cristal, as bactérias geneticamente modificadas BtCry1Ia, BtCry1Ba6 e BtCry10Aa, inoculadas em tiras de papel filtro (figura 16), foram submetidas ao crescimento e posterior processo de secagem em liofilizador. Todo o procedimento descrito abaixo foi realizado nas dependências do Laboratório de Bacteriologia da Embrapa Recursos Genéticos – Cenargen, Brasília, DF.

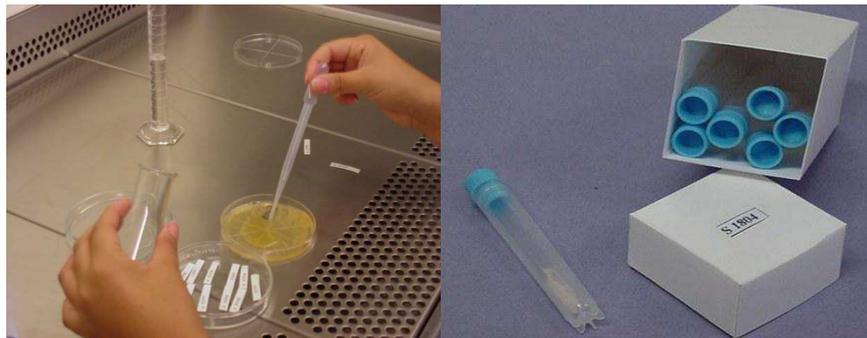


Figura 16. Conservação das bactérias em tiras de papel filtro. Fonte: Monnerat, 2011.

]

Meio de cultura NYSM

O meio de cultura nutritivo NYSM (Yousten, 1989) (nutrient broth, yeast extract, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$) consiste na adição de:

- caldo nutritivo.....13 g.L⁻¹
- extrato de levedura.....0.5 g.L⁻¹
- KH_2PO_46,8 g.L⁻¹
- Solução de sais minerais.....1% v/v

Os reagentes foram diluídos em 1000 mL de água destilada, e dissolvidos em agitador magnético. O pH foi ajustado para 7,0 com adição de NaOH (5 M), para solução ácida ou HCl (6 M), para solução básica.

A solução de sais minerais consiste em 0,02 g.L⁻¹ de CaCl₂, 0,3 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,02 g.L⁻¹ de Fe(SO₄)₃, 0,02 g.L⁻¹ de MnSO₄, 0,02 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O.

Posteriormente, o meio de cultura foi dividido em Erlenmeyers conforme o volume de meio de cultura utilizado e autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Em média, foram distribuídos 600 mL de meio de cultura em seis Erlenmeyers de 2 L.

Pré-inóculo

A pré-inoculação foi realizada em Erlenmeyers de 50 mL, com cerca de 15 mL de meio de cultura NYSM (Yousten, 1989) e uma tira de papel filtro com a bactéria inoculada. Para a inoculação de Cry1Ba6 e Cry10Aa usou-se 10 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol (para células transformadas com pGEMCry1Ba6 e pSVPcry10A) e para inoculação de Cry1Ia foram utilizados 10 µg.mL⁻¹ de eritromicina (para células transformadas com pHTPcry1Ia). Em seguida, os Erlenmeyers foram mantidos em incubador rotativo a 170 rpm, 26 °C, durante 16 horas. Todo o procedimento foi realizado em módulo de fluxo laminar devidamente esterilizado com luz ultravioleta (UV) por 20 minutos.

Inóculo

As bactérias recombinantes foram crescidas em meio NYSM seletivo com 10 µg.mL⁻¹ de eritromicina (para células transformadas com pHTPcry1Ia) e 10 µg.mL⁻¹ de eritromicina (para células transformadas com pSVPcry10A e pGEMCry1Ba6) a 170 rpm, 26 °C, durante 72 horas.

Centrifugação e secagem

Após as 72 horas de crescimento, em incubadora rotativa, foi realizada análise de microscopia do material a fim de avaliar a taxa de esporulação da bactéria. Com mais de 70% de esporos-cristais, o material era considerado viável para uso, sendo centrifugado em tubos falcon de 50 mL, marca TPP de fundo cônico e estéril, a 10.000 rpm por 30 minutos. Ao término do processo de centrifugação o meio de cultura foi descartado, o pellet mantido, os

tubos lacrados com película plástica semi-transparente “*parafilm*” e deixados em freezer para posterior liofilização.

Após o procedimento de liofilização, que consistiu em 48 horas seguidas de secagem, os esporos-cristais foram macerados e mantidos em dessecador até o momento do uso.

3.2 Unidade formadora de colônia (UFC)

A unidade formadora de colônia preconiza o quanto de células viáveis existem em determinada amostra de esporo-cristal. Este procedimento foi realizado de acordo com Alves e Moraes (1998).

Meio de cultura NYSM sólido

Para o preparo do meio de cultura sólido foram adicionados à 1 L de água destilada:

- extrato de levedura.....0,5 g.L⁻¹
- KH₂PO₄..... 6,8 g.L⁻¹
- sais minerais.....1% v/v

O pH foi ajustado para 7,0 com adição de NaOH (5 M), para solução ácida ou HCl (6 M), para solução básica. Em seguida, foram acrescentados 10 g de ágar nutritivo em cada Erlenmeyer (capacidade 1 L) e 500 mL da solução acima.

Após autoclavagem, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri descartáveis estéreis, e com posterior solidificação, as placas foram vedadas com filme PVC e mantidas durante a noite em estufa.

As placas que não demonstraram contaminação foram mantidas em geladeira até o momento do uso.

Plaqueamento

Em uma módulo de fluxo laminar foram deixados por 20 minutos sob exposição UV: tubos de ensaio devidamente autoclavados; suporte para tubo de ensaio; descarte; filme PVC; água destilada estéril; micropipetas de 5000 µL, 1000 µL e 200 µL; ponteiros estéreis; vórtex e alça de Drigalski.

Cinco tubos de ensaio foram enumerados conforme a figura 17:

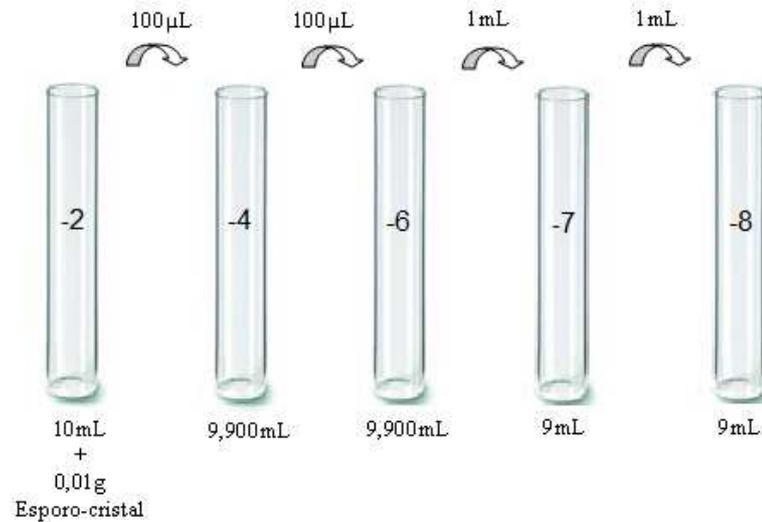


Figura 17. Diluição seriada para posterior plaqueamento.

Conforme ilustra a imagem anterior, em 10 mL de água destilada autoclavada foram diluídos 0,01 g de esporo-cristal (diluição -2). A diluição -2 foi homogeneizada em vórtex, e para composição da diluição -4, foram acrescentados a 9,9 mL de água destilada 100 µL da diluição anterior. O mesmo procedeu-se para a diluição -6. Nas diluições -7 e -8 foram acrescentados à 9 mL de água destilada 1 mL das diluições anteriores, -6 e -7, respectivamente. O procedimento foi mantido para as três variedades de bactérias, com exceção da BtCry1Ba6 utilizada no experimento com camundongo, onde se pesou 0,1 g de esporo-cristal.

Somente as três últimas diluições, -6, -7 e -8, foram plaqueadas e em três replicatas. Para cada replicata foram plaqueados 100 µL da diluição correspondente, anteriormente homogeneizada, com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram vedadas com filme PVC, de forma que o meio de cultura estivesse voltado para cima, e mantidas em estufa por aproximadamente 14 horas, para posterior contagem.

Contagem UFC

Para as três replicatas de cada diluição da mesma bactéria, foram contabilizados os números de colônias crescidas (figura 18), e calculou-se a média para obtenção do número de células por mL.

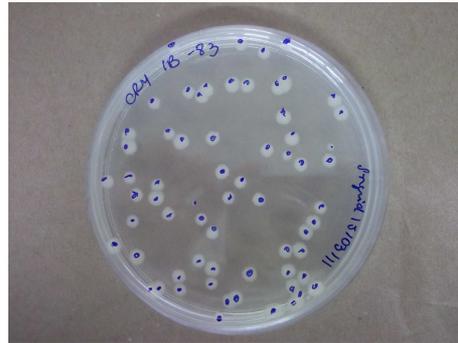


Figura 18. Colônias de Bt.

3.3 Conformidade segundo comitê de ética em pesquisa animal

O trabalho intitulado como “Avaliação da Genotoxicidade, Citotoxicidade e da Hematotoxicidade do Complexo Esporo-Cristal de Estirpes Recombinantes de *Bacillus thuringiensis* em Organismos Não-Alvo” obteve parecer favorável do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

A fim de minimizar os sofrimentos decorrentes dos procedimentos de cunho científico, todo estudo foi favorável a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Brasil, 2008), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, e também seguiram a Resolução Nº 714/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, o Manual de Utilização de Animais CEUA (Fiocruz, 2008) e *American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia* (AVMA, 2007).

Após realização dos experimentos, os animais eutanasiados foram encaminhados para a Comissão de Gerenciamento, Tratamento e Destinação de Resíduos Biológicos da Universidade de Brasília.

3.4 Delineamento experimental com *Oreochromis niloticus* – tilápia do nilo

No ensaio de toxicidade para organismos aquáticos, foram utilizados peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (figura 19), conhecida como tilápia. Os animais foram mantidos em

aquários apropriados, com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, no Departamento de Genética e Morfologia (GEM – IB - UnB), localizado no Laboratório de Genética Toxicológica.



Figura 19. *Oreochromis niloticus*.

A água utilizada durante a experimentação foi proveniente da rede de abastecimento, anteriormente submetida a um sistema de filtro de carvão ativado para retirada do cloro (Cl), as demais impurezas da água foram removidas pela utilização de filtro de nitrocelulose e posterior utilização do filtro de luz ultravioleta. Os animais receberam ração comercial para peixe, uma vez ao dia.

O delineamento experimental foi desenvolvido em sistema estático, e teve como base o protocolo para Teste de Toxicidade Aguda para Peixes N° 203/1992 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), com modificações. Conforme protocolo, foram utilizados 10 animais para cada tratamento, expostos em aquários com 30 L de água tratada, por 96 horas de exposição.

Para cada esporo-cristal, Cry1Ia, Cry1Ba6 e Cry10Aa, foram testadas três concentrações: 25 mg/L, 50 mg/L, dose intermediária, e a máxima de 100 mg/L, totalizando nove grupos tratados e um controle negativo, expostos à água tratada da rede de abastecimento (figura 20).



Figura 20. Exposição de tilápias à esporos- cristais de Bt.

O complexo esporo-cristal em suspensão aquosa foi previamente sonicado em aparelho desruptor de célula ultrassônico, marca Unique, para a liberação do cristal, em aproximadamente 10 mL de água do volume total do aquário, com três pulsos de duração e intervalos de um minuto, e sob um Becker com gelo, a fim de evitar possíveis danos aos cristais em virtude do aumento de temperatura.

Em aparelho multiparâmetro, marca Hanna, modelo v 1.4, foram analisados os seguintes parâmetros de todos os grupos expostos incluindo o controle negativo; oxigênio dissolvido (DO); temperatura e salinidade. No aparelho marca Hanna, modelo HI93703, foi avaliada a turbidez. O pH foi medido em pHmetro, marca PHTEK, e o valor da amônia total obtido por meio de teste para amônia tóxica da marca LabconTest.

Os peixes utilizados nos experimentos foram cedidos pela Estação de Piscicultura do Governo do Distrito Federal (Granja do Ipê - DF), e tinham em média 9 g e 23 cm de comprimento.

A genotoxicidade foi avaliada pelo teste do cometa e pela frequência de micronúcleos e anomalias nucleares em eritrócitos de sangue periférico.

3.4.1 Procedimento de coleta

Após as 96 horas de exposição, em seringas com ácido etilenodiaminotetracéticos (EDTA 20%), foram coletados aproximadamente 0,2 mL de sangue de cada animal por punção cardíaca e em seguida, os animais foram sacrificados por decapitação e secção da medula espinhal, seguido por mielotomia.

3.4.2 Frequência de micronúcleos e anomalias nucleares

Para realização deste ensaio seguiu-se protocolo de Schmid (1975), com modificações. Para o teste de frequência de micronúcleos e anomalias nucleares, realizou-se esfregação em duplicata para cada indivíduo, as lâminas foram fixadas por 7 minutos com metanol P.A e posteriormente, coradas com Giemsa a 5% por 20 minutos.

Em microscopia de luz, magnificação de 1000 X, foram avaliados em teste cego 3000 eritrócitos, 1500 por lâmina, onde se contabilizou os micronúcleos (MN) nas 2000 primeiras células e as anomalias nucleares no total de 3000. Considerou-se anomalia nuclear os eritrócitos que continham núcleos com acentuada irregularidade, e para análise de eritrócitos micronucleados foram adotados os critérios seguintes (Fenech, 2000):

1. O micronúcleo deve ser um terço menor que o núcleo principal;
2. O micronúcleo não deve tocar no núcleo principal;
3. Não deve ser refringente, ou seja, deve ter mesma coloração e intensidade do micronúcleo principal.

3.4.3 Teste do cometa

O teste do cometa foi desenvolvido conforme protocolos experimentais de Singh e colaboradores (1988), com adaptações.

Preparo das lâminas

Foram selecionadas lâminas de ponta fosca previamente riscadas nas extremidades e no centro, foram mergulhadas em 1,5% de agarose ponto de fusão normal em solução salina PBS e colocadas para secar a temperatura ambiente.

Realização do teste

Após obtenção do sangue, uma gota foi diluída em 500 µL de soro fetal bovino, ou soro HAM, em microtubos, marca *Eppendorfs* de 1 mL devidamente identificados.

Desta solução acima, foram coletados 20 μL e misturados a 120 μL de 0,5% de agarose baixo ponto de fusão (Gibco BRL ®) em solução salina PBS a 37 °C. Esse material foi homogeneizado com auxílio de micropipeta, distribuído nas lâminas, as quais foram cobertas com lamínulas e mantidas em geladeira (4°C) por 20 minutos para secagem.

Após solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise fresca contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris (pH ajustado para 10,0 com NaOH), 1% de N-lauril sarcosina, 1 mL de Triton X-100 e 10 DMSO. A solução de lise fresca foi preparada a partir de uma solução-estoque contendo NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM e Tris 10 mM. Protegidas da luz, as lâminas permaneceram nessa solução, mantidas a 4 °C permanecendo nessa por no mínimo uma hora.

Posteriormente, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e submersas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13.0) recém preparado e mantido a 4 °C. Após 20 minutos de submersão neste tampão procede-se com a eletroforese a 250 V, 350 mA a 4 °C durante 20 minutos. A seguir, as lâminas foram transferidas para uma cuba contendo tampão de neutralização (0,4 M Tris-HCl; pH 7,5). A cada 5 minutos as lâminas eram retiradas do tampão, permanecendo a temperatura ambiente durante 5 minutos e depois retornando por mais 5 minutos ao tampão, e assim sucessivamente, num total de 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas para secar a temperatura ambiente durante 1 hora e foram posteriormente fixadas em etanol 100% por 7 minutos. Após secagem, as lâminas foram guardadas a 4°C até o momento de uso. Todas as etapas foram realizadas em ausência de luz direta (penumbra) para evitar danos adicionais no DNA.

Coloração e análise

Foram avaliadas 100 células por indivíduo, e o processo de coloração foi feito com brometo de etídio a 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A avaliação visual foi feita através de um microscópio de fluorescência Axioskop-II da Carl Zeiss ®, filtro de 510-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400x, utilizando-se as 5 classes de cometa propostas por Collins (1995), conforme ilustra figura 21, e o índice de danos no DNA foi calculado de acordo com Jaloszyński e colaboradores (1997).

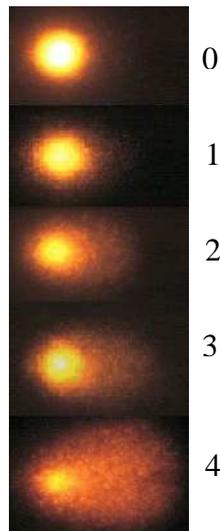


Figura 21. Níveis de fragmentação do DNA pelo teste do cometa.

Para a quantificação do dano no DNA, o escore total para 100 células analisadas variou de 0 (dano mínimo) a 400 (dano máximo) de acordo com Jaloszynski (1997), sendo utilizada a fórmula:

$$ID \text{ (ua)} = \frac{N1+2N2+3N3+4N4}{S/100}$$

ID = índice de danos no DNA;

ua = unidade arbitrária;

N1 – N4 = nucleoides nas classes 1,2,3 e 4;

S = número de nucleoides analisados, incluindo os da classe 0.

3.5 Delineamento experimental com camundongos

No experimento de toxicidade para mamíferos foram utilizados seis camundongos machos, idosos, não isogênicos de linhagem Swiss (CD-1), procedentes da CEMIB – Unicamp – SP, com idade de quatro meses.

Anteriormente à administração de esporos-crisais de Bt, o material foi sonicado nas mesmas condições dos que foram usados no ensaio para peixe.

Para cada esporo-cristal, Cry1Ia, Cry1Ba6 e Cry10Aa, foram testadas três concentrações: 27, 136 e 270 mg/Kg diluídas em solução salina 0,9 % e um grupo controle, onde se administrou água filtrada. A administração foi realizada por gavagem, com o auxílio de seringa orogástrica, e as doses administradas foram de acordo com protocolo já estabelecido no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade de Brasília.

Após 72 horas de exposição, os animais foram anestesiados com anestesiados com uma solução de xilazina (10 mg/Kg) + ketamina (80 mg/Kg) via intraperitoneal (IP), para obtenção de cerca de 0,4 mL de sangue por punção cardíaca. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Durante o experimento foram disponibilizados ração e água “*ad libitum*” para os animais, e todo procedimento ocorreu nas dependências do biotério e do Laboratório de Genética Toxicológica do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília – UnB.

3.5.1 Teste do micronúcleo e teste de proliferação celular

A genotoxicidade foi avaliada pela frequência de micronúcleos analisados em esfregaço sanguíneo e a citotoxicidade através da inibição da proliferação de eritrócitos policromáticos.

Em lâminas anteriormente limpas e identificadas foram feitos esfregaços em duplicata para cada animal. Depois de secas, as lâminas foram fixadas em metanol P.A por 7 minutos, e somente no momento da análise as lâminas foram coradas com laranja de acridina, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de água destilada. O processo de coloração das lâminas consistiu em pingar aproximadamente duas ou três gotas na lâmina, cobrir com lamínula para melhor distribuição

do corante por mais ou menos 3 minutos, lavar em água corrente e fraca, e deixar as lâminas secarem para melhor visualização do material.

Num total de 3000 células, contabilizadas em contador manual, verificou-se a proporção de eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC), sendo que nas primeiras 2000 foram observadas a presença ou não de micronúcleos. As porcentagens de EPC e ENC foram calculadas pelas fórmulas que se seguem:

$$\%EPC = \frac{PC}{PC + NC} \times 100 \qquad \%ENC = \frac{NC}{PC + NC} \times 100$$

Os critérios adotados para a caracterização de micronúcleos foram os mesmos usados para peixe, de acordo com Fenech (2000). A genotoxicidade foi avaliada pela frequência de micronúcleos e a citotoxicidade através da inibição da proliferação de eritrócitos policromáticos em esfregaço de sangue periférico.

3.5.2 Hematologia

A hematotoxicidade foi avaliada por meio de leucograma, plaquetograma e eritograma.

Após obtenção do sangue periférico, realizou-se hemograma completo em hematímetro veterinário automático, calibrado para camundongos, marca Sysmex pocH-100iV Diff, onde as seguintes alterações hematológicas foram verificadas: número de células brancas, número de células vermelhas, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, média de hemoglobina corpuscular, média da concentração de hemoglobina corpuscular e número de plaquetas.

3.6 Análise estatística

Os resultados da análise estatística foram obtidos por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 e Graphpad Primas versão 5.00. Os dados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média), os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, e $p < 0,01$, altamente significativo. As variáveis

contínuas foram testadas para distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Para verificação de possíveis diferenças entre os grupos avaliados foram usados os testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis (para dados não distribuídos de forma normal), e para comparações 2 a 2, foram utilizados os testes de Tukey ou Mann-Whitney. Os valores de p com significado estatístico ($p < 0,05$) só foram considerados quando também assumiram sentido biológico e, para tanto, atenderam os seguintes critérios:

- Controle negativo comparado com todos os tratamentos;
- Comparações entre doses diferentes dos mesmos complexos esporo-cristal (avaliação dose-efeito ou concentração-efeito);
- Comparações entre diferentes esporos-cristais na mesma dose/concentração.

4.1 Resultados *Oreochromis niloticus*

4.1.1 UFC das estirpes usadas em tilápias

Na tabela 1, está representado a quantidade de unidade formadora de colônia (UFC) do complexo esporo-cristal utilizada nos experimentos com tilápias.

Tabela 1. UFC das estirpes usadas no delineamento experimental com tilápias.

Proteína	Quantidade de células por mL		
	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
Cry1Ba6	10^7	2×10^7	8×10^7
Cry1Ia	4×10^6	8×10^6	5×10^7
Cry10Aa	10^7	5×10^7	9×10^7

4.1.2 Morbidade e mortalidade

Durante o período experimental foram observados sinais de morbidade ou outras ocorrências de anormalidades visíveis, como perda de equilíbrio, alterações natatórias, respiratórias, funcionais ou de pigmentação.

Apenas um indivíduo morreu no controle negativo, e para os demais tratamentos a mortalidade é apresentada na tabela 2, na qual se pode observar que a concentração de 100 mg/L do complexo esporo-cristal de Cry1Ia promoveu mortalidade de 30% dos peixes.

Tabela 2. Mortalidade de tilápias expostas a esporos-cristais de Bt.

Proteína	Concentração		
	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
Cry1Ba6	0	0	1
Cry1Ia	0	1	3
Cry10Aa	1	1	1

4.1.3 Avaliação de diferentes parâmetros físico-químicos da água

No valor de pH houve uma variação de $\pm 1,0$ nos grupos tratados e no grupo controle, sendo 6,5 o valor mínimo determinado, e o máximo de 7,7. Para todos os grupos o valor da temperatura da água mostrou uma variação ± 1 C°. Quanto ao parâmetro turbidez, apenas o controle negativo teve aumento em seu valor ao término do experimento, considerando que no início do experimento, o valor foi de 0 (zero) UNT (unidades nefelométrica de turbidez), e para os demais tratamentos, os valores sofreram diminuição, visto que no primeiro dia de exposição esses valores chegaram a ± 30 UNT. Em salinidade, observou-se aumento no valor em todos os grupos. Durante 96 horas de exposição, o OD foi diminuindo gradativamente, sendo a máxima de 7,0 mg/L e o mínimo de 4,3 mg/L, e em contrapartida, a amônia total teve um aumento crítico ao longo do experimento, chegando até 3,5 mg/L no grupo controle, e 6,5 mg/L nos grupos tratados.

4.1.4 Teste do cometa

De acordo com a figura 22, apenas os tratamentos com Cry1Ia mostraram alterações significativas em seus resultados em comparações 2-a-2. De acordo com o teste de Mann Whitney, para porcentagem de danos moderados, apenas Cry1Ia a 25 e a 100 mg/L mostrou um aumento significativo em relação ao grupo controle negativo ($p= 0,002$ e $p= 0,034$,

respectivamente). Entretanto, não foi observado a indução de danos elevados, $p= 0,001$ (25 mg/L) e $p= 0,000$ (100 mg/L).

O grupo Cry1Ia 25 mg/L teve aumento na porcentagem de danos moderados quando comparado a Cry10Aa e Cry1Ba6 na mesma concentração ($p= 0,000$ para ambos), e diminuição significativa, $p= 0,013$, em seus danos elevados em relação a Cry10Aa na menor concentração. Cry1Ia a 50 mg/L sofreu uma redução em seus danos moderados quando comparado a Cry10Aa a 50 ($p= 0,030$), e a Cry1Ia a 25 ($p= 0,000$). Esse grupo também obteve um aumento significativo nos danos elevados em relação ao mesmo tratamento, mas na dose de 25 mg/L ($p= 0,000$). Para Cry1Ia a 100 seu dano moderado foi significativo comparado a Cry10Aa e Cry1Ba6 a 100 ($p= 0,034$ e $p= 0,013$), e a Cry1Ia a 50 ($p= 0,002$). Para esse mesmo grupo, os danos elevados mostraram diminuição altamente significativa ($p= 0,000$) ao ser comparado a ele mesmo na dose de 50 mg/L, e diminuição significativa, com $p= 0,011$ para ambos, em relação a Cry10Aa e Cry1Ba6 a 100 mg/L.

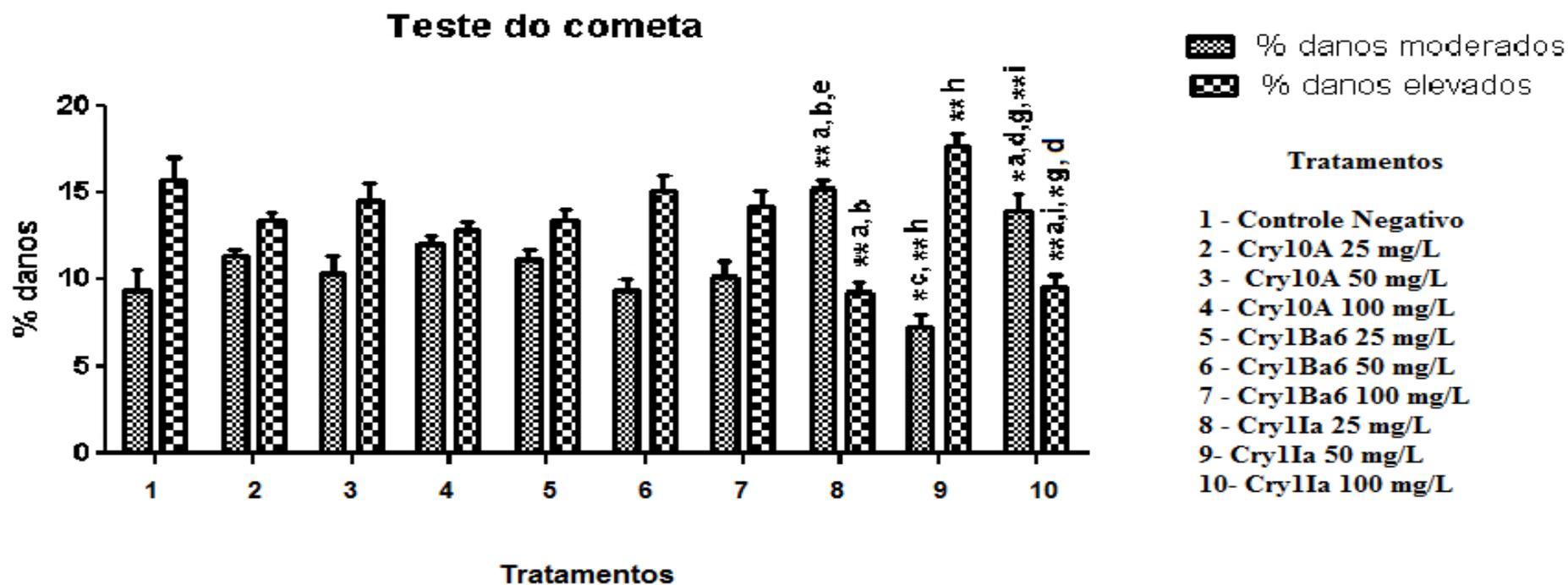


Figura 22. Porcentagem de danos moderados e elevados no DNA de *Oreochromis niloticus* expostos aos esporos-cristais de *Bacillus thuringiensis*, Cry1Ba6, Cry1Ia, Cry10Aa, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/L.

Os dados correspondem à média \pm erro padrão da média (EP). As letras indicam diferenças nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann Whitney. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) e altamente significativas ($p < 0,01$), sendo c= significativo comparado com o grupo 3; h= significativo comparado com o grupo 8.

As figuras 23 A e B ilustram os níveis das fragmentações pelo teste do cometa, danos moderados, níveis 1 e 2, danos elevados, níveis 3 e 4.

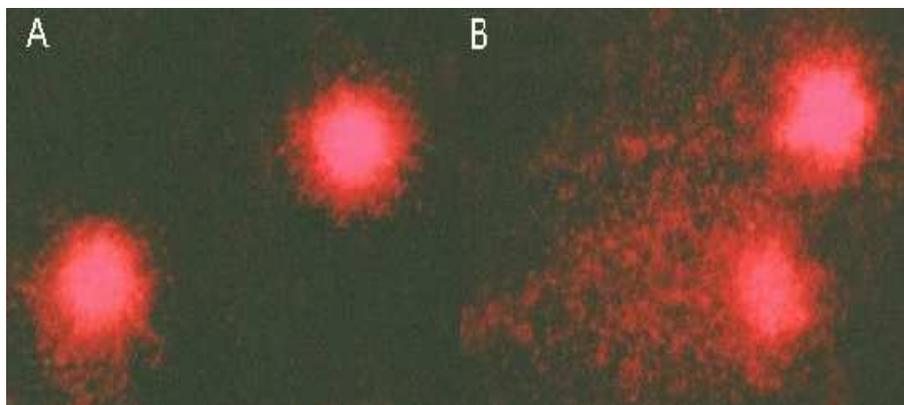


Figura 23. A - Cometas de níveis 1 e 2 (dano moderado), e em B, cometas de níveis 3 e 4 (dano elevado).

4.1.5 Frequência de micronúcleos e anomalias nucleares

Pelo teste de Mann-Whitney não foram observados valores significativos para micronúcleo entre os diferentes grupos tratados (Figura 24), e também quando relacionados ao controle negativo. Em anomalias nucleares Cry1Ba6 a 50 mg/L sofreu diminuição significativa quando comparado a Cry10Aa na mesma concentração ($p= 0,038$), e Cry1Ia na dose máxima mostrou diminuição significativa ($p= 0,005$) nas anomalias nucleares em relação ao grupo Cry1Ia na concentração mínima de 25 mg/L.

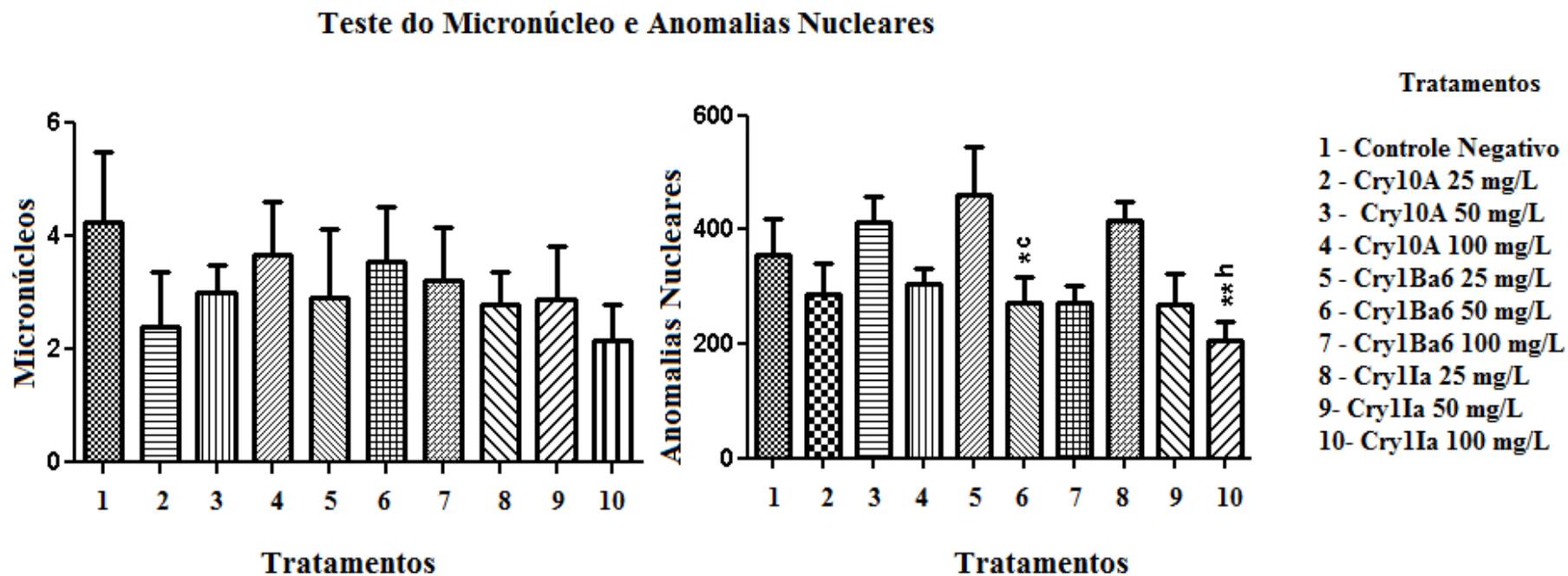


Figura 24. Frequência de micronúcleos e anomalias nucleares de *Oreochromis niloticus* expostos a esporo-cristal de *Bacillus thuringiensis*, Cry1Ba6, Cry1Ia, Cry10Aa, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/L.

Os dados correspondem à média \pm erro padrão da média (EP). As letras indicam diferenças nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann Whitney. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) e altamente significativas ($p < 0,01$), sendo c= significativo comparado com o grupo 3; h= significativo comparado com o grupo 8.

A figura 25 A ilustra um micronúcleo em eritrócito de sangue periférico de peixe, e na outra figura (figura 25 B), são indicadas pelas setas anomalias nucleares.

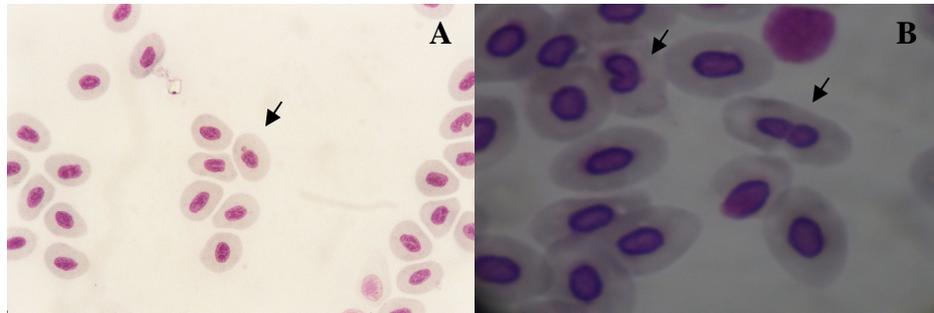


Figura 25. Micronúcleo e anomalia nuclear em tilápias. Indicados pelas setas, em A, micronúcleo em eritrócito de peixe, e em B, diferentes anomalias nucleares em células de Tilápias expostas ao complexo esporo-cristal Cry.

4.2 Resultados camundongos

4.2.1 UFC das estirpes usadas em camundongos

Na tabela 3 são mostrados os resultados da unidade formadora de colônia (UFC) dos complexos esporos-cristais de *Bacillus thuringiensis* usados em camundongos.

Tabela 3. UFC das estirpes usadas no delineamento experimental com camundongos. Os resultados são dados em quantidade de células administradas.

Proteína	Quantidade de células		
	27 mg/Kg	136 mg/Kg	270 mg/Kg
Cry1Ba6	4×10^8	2×10^9	4×10^9
Cry1Ia	4×10^8	2×10^9	4×10^9
Cry10Aa	1×10^9	5×10^9	1×10^{10}

4.2.2 Teste do micronúcleo e teste de proliferação celular

Conforme a tabela 4 ilustra, na análise de micronúcleo nenhum dos grupos tratados apresentou alterações significativas quando comparados ao controle com água. No parâmetro eritrócitos policromáticos, Cry10Aa a 27 mg/Kg mostrou diminuição significativa quando comparada ao controle negativo, $p= 0,014$, e o mesmo resultado de p foi encontrado para o aumento no seu número de células neste mesmo grupo tratado com relação ao controle negativo em ENC. Resultados semelhantes foram observados na porcentagem de eritrócito policromático (EPC) e normocromático (ENC).

Em comparações 2-a-2 nos resultados de MN-EPC, Cry10Aa a 136 teve aumento significativo quando comparado a Cry10Aa a 27, e diminuição significativa quando comparado a Cry10Aa na dose máxima, $p= 0,006$ para ambos. Nesse mesmo parâmetro, Cry1Ba6 a 136 também apresentou diminuição significativa quando comparado a Cry10Aa na mesma concentração ($p= 0,006$). Em MN-ENC, apenas Cry10Aa a 270 teve diminuição significativa em seu valor quando comparado a ele mesmo na concentração de 136, $p= 0,033$. Para EPC e ENC apenas Cry10Aa a 136 quando comparado a Cry10Aa a 27 sofreu um aumento significativo em EPC ($p= 0,002$), e diminuição significativa em ENC, com mesmo valor de p . Resultados idênticos foram detectados na porcentagem de EPC e ENC.

Tabela 4 - Resultados de teste de micronúcleo no sangue periférico de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais Cry1Ba6, Cry1Ia e Cry10Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente 72h antes da eutanásia. O controle negativo recebeu água filtrada.

Grupo	Tratamento	EPC	ENC	MN-EPC	MN-ENC	%EPC	%ENC
1	Água filtrada	564,17 ± 31,02	2435,83 ± 31,02	0,67 ± 0,33	10,67 ± 1,54	18,81 ± 1,03	81,19 ± 1,03
2	Cry 10A (27 mg/Kg)	267,33 ± 37,52 ^{*a}	2732,67 ± 37,52 ^{*a}	0,17 ± 0,17	9,67 ± 2,04	8,91 ± 1,25 ^{*a}	91,09 ± 1,25 ^{*a}
3	Cry 10A (136 mg/Kg)	549,50 ± 66,56 ^{**b}	2450,50 ± 66,56 ^{**b}	0,67 ± 0,21 ^{**b}	9,33 ± 1,17	18,32 ± 2,22 ^{*b}	81,68 ± 2,22 ^{*b}
4	Cry 10A (270 mg/Kg)	505,83 ± 65,7	2494,17 ± 65,70	0,17 ± 0,17 ^{**c}	7,83 ± 1,58 ^{*c}	16,86 ± 2,19	83,14 ± 2,19
5	Cry 1B (27 mg/Kg)	471,50 ± 44,31	2528,50 ± 44,31	0,33 ± 0,21	15,50 ± 3,76	15,72 ± 1,48	84,28 ± 1,48
6	Cry 1B (136 mg/Kg)	565,17 ± 80,97	2434,83 ± 80,97	0,17 ± 0,17 ^{**c}	17,33 ± 3,66	18,84 ± 2,70	81,16 ± 2,70
7	Cry 1B (270 mg/Kg)	503,50 ± 60,47	2496,50 ± 60,47	0,33 ± 0,21	12,17 ± 3,25	16,78 ± 2,02	83,22 ± 2,02
8	Cry 1Ia (27 mg/Kg)	308,33 ± 38,87	2691,67 ± 38,87	0,67 ± 0,33	8,33 ± 1,45	10,28 ± 1,30	89,72 ± 1,3
9	Cry 1Ia (136 mg/Kg)	454,33 ± 71,11	2545,67 ± 71,11	0,83 ± 0,40	11,33 ± 1,43	15,14 ± 2,37	84,86 ± 2,37
10	Cry 1Ia (270 mg/Kg)	520,00 ± 44,59	2480,00 ± 44,59	0,67 ± 0,33	11,67 ± 2,78	17,33 ± 1,49	82,67 ± 1,49
P-valores		0,001	0,001	0,076	0,017	0,001	0,001

Os dados correspondem à média ± erro padrão da média (EP). EPC = Eritrócito policromático; ENC= eritrócito normocromático; MN-EPC= número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos; MN-ENC= número de micronúcleos em eritrócitos normocromáticos. Para MN-EPC, o valor de p foi gerado pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto para as demais variáveis, os p-valores foram gerados por ANOVA. As letras indicam diferenças significativas detectadas pelos testes de Mann-Whitney (MN-EPC) ou Tukey (demais variáveis). Os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) e altamente significativas (p<0,01), sendo a= significativo em relação ao grupo 1; b= significativo em relação ao grupo 2.

As figuras 26 A e B mostram a diferença entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos corados com laranja de acridina, sendo que as setas indicam micronúcleos presentes nesta linhagem celular.

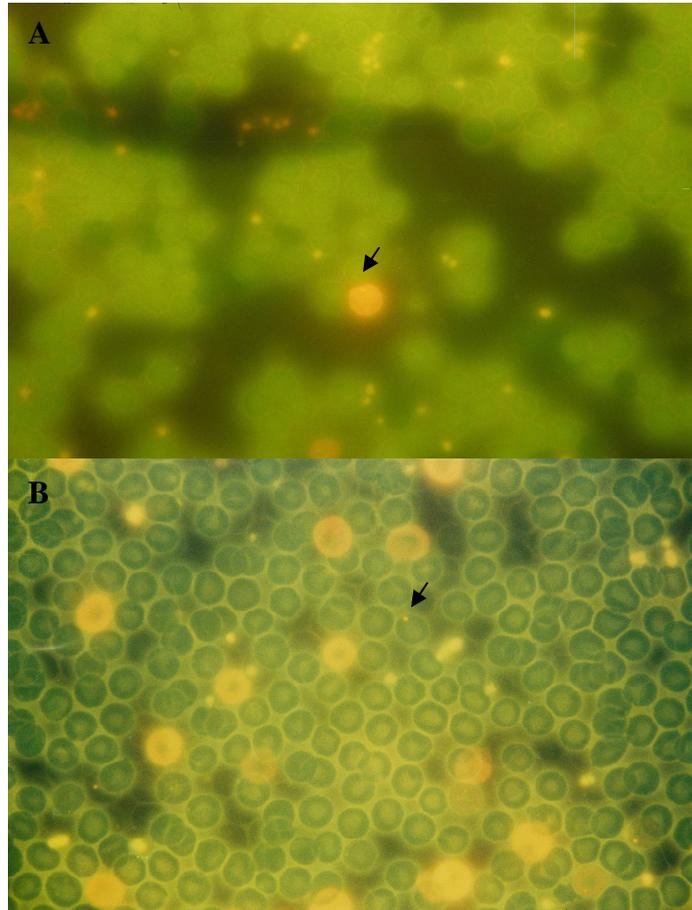


Figura 26. Eritrócitos policromáticos e normocromáticos de camundongos corados com laranja de acridina. As células alaranjadas são eritrócitos policromáticos e as verdes, os normocromáticos. Em A, MN em eritrócito PCN, e em B, MN em ENC, conforme indicam as setas.

4.2.3 Hemograma

4.2.3.1 Eritrograma

Conforme demonstra a tabela 5, diferenças significativas foram detectadas pelo teste de ANOVA para hemoglobina (HGB) ($p=0,009$), hematócito (HCT) ($p=0,005$), eritrócitos e na variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) ($p=0,001$), hemoglobina corpuscular média (HCM) e volume corpuscular médio (VCM) apresentaram mesmos valores de p ($p=0,000$). O valor de concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) ($p=0,00$) foi obtido por meio do teste de Kruskal Wallis.

Pelo teste de Tukey, comparações 2 a 2, todos os grupos tratados apresentaram diminuição significativa em HCM ($p<0,01$) quando comparados ao controle negativo. Ainda em relação ao controle negativo, em VCM os resultados foram semelhantes a esses, com exceção dos tratados com Cry1Ia e com a menor dose de Cry10Aa, os quais não apresentaram p significativo. Para RDW apenas dois grupos tratados com Cry1Ia mostraram aumento em seus valores quando comparados ao grupo controle, $p=0,022$, na dose intermediária, e $p=0,00$, na dose máxima. Pelo teste de Mann Whitney, CHCM mostrou diminuição significativa em relação ao grupo controle, $p<0,05$, para todos os grupos tratados com esporos-cristais, com exceção de Cry1Ba6 a 27 mg/Kg.

Em comparações entre grupos tratados com esporos-cristais, o valor de eritrócitos teve aumento significativo comparando Cry1Ba6 e Cry10Aa a 136 mg/Kg ($p=0,042$) e também quando se comparou esses grupos na dose máxima ($p=0,015$). Não houve diferença significativa nos valores de HGB, e para HCT, apenas Cry1Ba6 a 270 teve aumento significativo comparado a Cry10Aa na mesma dose ($p=0,035$). Para CHCM, Cry1Ba6 a 27 comparado a Cry10Aa na mesma concentração mostrou aumento em seu valor ($p=0,006$), assim como Cry1Ia a 270 mostrou uma diminuição ao ser comparado a Cry10A a 270 ($p=0,045$). Em comparações entre diferentes doses num mesmo tratado, ainda para CHCM, uma diminuição significativa, $p<0,05$, foi detectada comparando os grupos Cry1Ba6 a 136 e a 270 ao grupo Cry1Ba6 a 27 mg/Kg, e outra diminuição foi percebida ao comparar Cry1Ia a 270 a 27 ($p=0,016$), e Cry1Ia a 270 a 136 ($p=0,037$).

Tabela 5. Eritrograma de camundongos Swiss tratados com esporos-cristais Cry1Ba6, Cry1Ia e Cry10Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente 72h antes da eutanásia. O controle negativo recebeu água filtrada.

Grupo	Tratamento	Eritrócitos	HGB	HCT	HCM	CHCM	VCM	RDW
		(x 10 ⁶ /μL)	(g/dL)	(%)	(pg)	(g/dL)	(fL)	(%)
1	Água filtrada	7,72 ± 0,20	12,22 ± 0,21	29,85 ± 0,61	15,85 ± 0,23	40,95 ± 0,38	38,68 ± 0,33	14,68 ± 0,89
2	Cry 10A (27 mg/Kg)	8,20 ± 0,16	11,97 ± 0,20	30,48 ± 0,56	14,60 ± 0,14 ^{**a}	39,27 ± 0,14 ^{**a}	37,17 ± 0,38	16,20 ± 0,36
3	Cry 10A (136 mg/Kg)	7,40 ± 0,21	10,63 ± 0,35	26,95 ± 0,88	14,37 ± 0,13 ^{**a}	39,45 ± 0,10 ^{**a}	36,38 ± 0,27 ^{**a}	15,95 ± 0,29
4	Cry 10A (270 mg/Kg)	7,55 ± 0,33	10,85 ± 0,53	27,60 ± 1,35	14,33 ± 0,23 ^{**a}	39,27 ± 0,29 ^{**a}	36,52 ± 0,59 ^{**a}	16,70 ± 0,68
5	Cry 1B (27 mg/Kg)	8,32 ± 0,12	12,15 ± 0,18	30,22 ± 0,38	14,60 ± 0,20 ^{**a}	40,23 ± 0,25 ^{**b}	36,35 ± 0,42 ^{**a}	15,40 ± 0,46
6	Cry 1B (136 mg/Kg)	8,46 ± 0,23 ^{*c}	11,97 ± 0,33	30,58 ± 0,83	14,15 ± 0,11 ^{**a}	39,12 ± 0,14 ^{**a,e}	36,13 ± 0,22 ^{**a}	16,53 ± 0,41
7	Cry 1B (270 mg/Kg)	8,73 ± 0,18 ^{*d}	12,30 ± 0,39	31,53 ± 0,76 ^{*d}	14,08 ± 0,19 ^{**a}	38,98 ± 0,33 ^{**a,*e}	36,13 ± 0,36 ^{**a}	16,50 ± 0,72
8	Cry 1Ia (27 mg/Kg)	7,72 ± 0,12	11,42 ± 0,18	28,68 ± 0,42	14,80 ± 0,08 ^{**a}	39,82 ± 0,31 ^{**a}	37,22 ± 0,36	17,55 ± 0,48
9	Cry 1Ia (136 mg/Kg)	8,04 ± 0,14	11,73 ± 0,24	29,70 ± 0,39	14,62 ± 0,21 ^{**a}	39,48 ± 0,32 ^{*a}	37,00 ± 0,42	17,82 ± 0,69 ^{*a}
10	Cry 1Ia (270 mg/Kg)	8,11 ± 0,37	11,63 ± 0,53	30,17 ± 1,22	14,43 ± 0,12 ^{**a}	38,50 ± 0,27 ^{**a,*d,f,g}	37,25 ± 0,33	19,02 ± 0,83 ^{**a}
P-valores		0,001	0,009	0,005	0,000	0,000	0,000	0,001

Os dados correspondem à média ± erro padrão da média (EP). HGB = Hemoglobina; HCT = Hematócito; VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; RDW = amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (do inglês *Red Cell Distribution Width*); g/dL = gramas por decilitros; fl = femtolitros; pg = picograma. Para CHCM, os valores de p foram gerados pelo teste de Kruskal Wallis, enquanto para as demais variáveis, tais valores foram gerados por ANOVA. As letras indicam diferenças nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann Whitney (CHCM) ou Tukey (demais variáveis). Os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) e altamente significativas (p<0,01), sendo a= significativo comparado com o grupo 1; b = significativo comparado com o grupo 2; c= significativo comparado com o grupo 3; d= significativo comparado com o grupo 4; e= significativo comparado com o grupo 5; f= significativo comparado com o grupo 8; g= significativo comparado com o grupo 9.

4.2.3.2 Leucograma

Em relação ao controle negativo, houve uma diminuição e um aumento significativo na porcentagem de linfócitos nos grupos tratados com Cry10Aa ($p= 0,037$) e Cry1Ba6 ($p=0,025$) a 270 mg/Kg, respectivamente. Considerando ainda comparações com grupo controle, observou-se a diminuição significativa no número de células de neutrófilos + monócitos em todos aqueles tratados com Cry1Ba6, a 27 ($p= 0,024$), a 136 ($p= 0,013$) e a 270 mg/Kg ($p= 0,016$).

Ao comparar diferentes esporos-cristais na mesma dose analisando o parâmetro de porcentagem de linfócitos, foram detectados aumentos significativos quando se comparou Cry1Ba6 e Cry10Aa a 136 ($p= 0,025$), Cry1Ba6 e Cry10A a 270 ($p= 0,004$), e ao se comparar Cry1Ia e Cry1Ba6 também na dose máxima ($p=0,010$). Na porcentagem de neutrófilos + monócitos houve diminuição significativa no valor de p quando se comparou Cry1Ba6 e Cry10Aa ($p = 0,005$) na dose máxima. Quanto ao número de neutrófilos + monócitos os valores mostraram uma diminuição significativa quando se comparou Cry1Ba6 e Cry10Aa a 27 ($p= 0,036$), e a 136 ($p= 0,016$), e um aumento nas comparações entre Cry1Ia e Cry1Ba6 a 27 ($p= 0,009$), a 136 ($p= 0,006$), e a 270 ($p= 0,016$). Nos demais parâmetros analisados os valores de p não foram significativos. Esses resultados podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6. Resultados do leucograma de camundongos Swiss tratados com esporos-cristais Cry1Ba6, Cry1Ia e Cry10Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente 72h antes da eutanásia. O controle negativo recebeu água filtrada.

G	Tratamento	Leucócitos totais (x 10 ³ /μL)	Linfócitos (%)	Neutrófilos + Monócitos (%)	Eosinófilos (%)	Linfócitos (x 10 ³ /μL)	Neutrófilos + Monócitos (x 10 ³ /μL)	Eosinófilos (x 10 ³ /μL)
1	Água filtrada	9,67 ± 1,19	51,32 ± 3,19	46,25 ± 3,07	2,43 ± 1,64	4,92 ± 0,63	4,48 ± 0,66	0,27 ± 0,19
2	Cry 10A (27 mg/Kg)	8,18 ± 1,16	47,33 ± 4,69	51,65 ± 4,85	1,02 ± 0,45	3,93 ± 0,73	4,15 ± 0,61	0,10 ± 0,07
3	Cry 10A (136 mg/Kg)	6,50 ± 1,07	43,27 ± 6,24	54,87 ± 6,22	1,87 ± 0,38	2,98 ± 0,76	3,42 ± 0,56	0,10 ± 0,03
4	Cry 10A (270 mg/Kg)	9,85 ± 3,52	35,20 ± 4,63 ^{*a}	61,08 ± 6,43	3,72 ± 2,25	2,87 ± 0,72	6,73 ± 2,80	0,25 ± 0,11
5	Cry 1B (27 mg/Kg)	6,12 ± 1,20	59,63 ± 3,80	38,35 ± 3,25	2,02 ± 1,92	3,75 ± 0,81	2,35 ± 0,48 ^{*a,b}	0,02 ± 0,02
6	Cry 1B (136 mg/Kg)	5,28 ± 1,00	61,87 ± 4,26 ^{*c}	35,82 ± 4,13	2,32 ± 1,90	3,47 ± 0,74	1,73 ± 0,34 ^{*a,c}	0,08 ± 0,07
7	Cry 1B (270 mg/Kg)	5,73 ± 1,47	65,02 ± 2,95 ^{*a,**d}	34,05 ± 2,58 ^{**d}	0,93 ± 0,55	3,90 ± 1,15	1,80 ± 0,35 ^{*a}	0,03 ± 0,02
8	Cry 1Ia (27 mg/Kg)	8,50 ± 0,88	52,58 ± 3,65	46,75 ± 3,74	0,67 ± 0,32	4,58 ± 0,67	3,87 ± 0,32 ^{**e}	0,05 ± 0,02
9	Cry 1Ia (136 mg/Kg)	9,83 ± 0,94	57,37 ± 5,82	41,73 ± 5,47	0,90 ± 0,53	5,73 ± 0,91	4,02 ± 0,50 ^{**f}	0,08 ± 0,03
10	Cry 1Ia (270 mg/Kg)	8,52 ± 1,40	44,37 ± 4,73 ^{*g}	53,97 ± 4,76	1,67 ± 0,46	3,82 ± 0,76	4,57 ± 0,86 ^{*g}	0,13 ± 0,06
P-valores		0,275	0,003	0,001	0,242	0,319	0,004	0,331

G= Grupo. Os dados correspondem à média ± erro padrão da média (EP). Para Linfócitos (%), Eosinófilos (%), Neutrófilos+Monócitos (x 10³/μL) e Eosinófilos (x 10³/μL), os valores de p foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto para as demais variáveis, tais valores foram gerados por ANOVA. As letras indicam diferenças significativas detectadas pelos testes de Mann-Whitney ou Tukey. Os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) e altamente significativas (p<0,01), sendo a= significativo em relação ao grupo 1; b= significativo em relação ao grupo 2; c= significativo em relação ao grupo 3; d= significativo em relação ao grupo 4; e= significativo em relação ao grupo 5; f= significativo em relação ao grupo 6; g= significativo em relação ao grupo 7.

4.2.3.3 Plaquetograma

De acordo com o teste de Tukey, nenhum dos tratamentos promoveu alteração significativa na população de plaquetas em relação ao grupo controle (tabela 7). Para volume plaquetário médio (VPM) todos os grupos tratados, com exceção de Cry1Ba6 a 27 mg/Kg, tiveram aumento significativo ($p < 0,05$) quando comparados ao controle com água. Em variação da distribuição do tamanho das plaquetas (PDW), apenas Cry10Aa a 27 ($p = 0,024$) e Cry1Ia em todas as concentrações administradas ($p = 0,006$; $p = 0,015$; $p = 0,027$, respectivamente) obtiveram aumento significativo em relação ao controle. Ainda de acordo com o grupo controle, porcentagem de plaquetas gigantes (P-LCR) teve aumento significativo ($p < 0,05$) em todos tratados com Cry10Aa, com Cry1Ba6 a 136 ($p = 0,007$) e a 270 ($p = 0,014$), e na dose máxima de Cry1Ia ($p = 0,002$).

Para plaquetas (PLT) os grupos tratados com Cry1Ba6 e Cry1Ia na dose de 27 mg/Kg, quando comparados a Cry10Aa na mesma concentração, sofreram aumento em seus valores, $p = 0,004$ para ambos. Cry1Ba6 e Cry1Ia também sofreram aumento quando comparados a Cry10Aa na concentração intermediária, $p = 0,028$ e $0,006$, respectivamente. Em VPM, apenas a concentração de 27 mg/Kg mostrou efeito significativo em comparações 2-a-2, com uma diminuição entre Cry1Ba6 e Cry10Aa ($p = 0,035$), e um aumento significativo entre Cry1Ia e Cry1Ba6 ($p = 0,011$). Resultados semelhantes foram detectados em PDW na mesma concentração entre Cry1Ba6 e Cry10Aa ($p = 0,022$), e entre Cry1Ia e Cry1Ba6 ($p = 0,005$).

Tabela 7. Resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais Cry1Ba6, Cry1Ia e Cry10Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente 72h antes da eutanásia. O controle negativo recebeu água filtrada.

Grupo	Tratamento	PLT (x 10 ³ /μL)	VPM (fl)	P-LCR (%)	PDW (fl)
1	Água filtrada	1413,33 ± 138,85	5,38 ± 1,08	5,83 ± 1,55	5,60 ± 1,12
2	Cry 10A (27 mg/Kg)	1149,50 ± 87,72	7,10 ± 0,17 ^{*a}	11,93 ± 1,34 ^{**a}	7,02 ± 0,09 ^{*a}
3	Cry 10A (136 mg/Kg)	1128,83 ± 64,71	7,07 ± 0,17 ^{*a}	11,15 ± 1,25 ^{*a}	7,07 ± 0,15
4	Cry 10A (270 mg/Kg)	1467,50 ± 206,34	7,13 ± 0,25 ^{*a}	11,93 ± 1,50 ^{*a}	6,93 ± 0,26
5	Cry 1B (27 mg/Kg)	1530,00 ± 39,61 ^{**b}	6,58 ± 0,03 ^{*b}	8,43 ± 0,38	6,68 ± 0,07 ^{*b}
6	Cry 1B (136 mg/Kg)	1449,40 ± 90,90 ^{**c}	7,14 ± 0,12 ^{*a}	12,16 ± 0,47 ^{**a}	7,10 ± 0,17
7	Cry 1B (270 mg/Kg)	1541,33 ± 59,24	7,04 ± 0,25 ^{*a}	11,76 ± 1,45 ^{*a}	7,06 ± 0,17
8	Cry 1Ia (27 mg/Kg)	1675,00 ± 55,71 ^{**b}	6,90 ± 0,09 ^{*a,d}	9,10 ± 0,60	7,13 ± 0,07 ^{**a,d}
9	Cry 1Ia (136 mg/Kg)	1789,67 ± 180,68 ^{**c}	7,00 ± 0,13 ^{*a}	9,87 ± 0,72	7,20 ± 0,12 ^{*a}
10	Cry 1Ia (270 mg/Kg)	1778,40 ± 200,69	7,34 ± 0,20 ^{*a}	12,70 ± 1,05 ^{**a}	7,38 ± 0,21 ^{*a}
P-valores		0,004	0,007	0,001	0,031

Os dados correspondem à média ± erro padrão da média (EP). PLT= plaquetas; VPM= volume plaquetário médio; P-LCR= percentagem de plaquetas gigantes (do inglês *Platelet larger cell ratio*); PDW= amplitude ou variação da distribuição do tamanho das plaquetas (do inglês *Platelet size deviation width*). Para P-LCR, os valores de p foram gerados por ANOVA, enquanto para as demais variáveis, tais valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras indicam diferenças nas comparações 2-a-2 detectadas pelos testes de Mann Whitney (P-LCR) ou Tukey (demais variáveis). Os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) e altamente significativas (p<0,01), sendo a= significativo em relação ao grupo 1; b= significativo em relação ao grupo 2; c= significativo em relação ao grupo 3; d= significativo em relação ao grupo 5.

5.1 Peixes - *Oreochromis niloticus*

A proteção dos ecossistemas depende da capacidade de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, buscando categorizar a influência antrópica sobre os sistemas biológicos (Vilches, 2009).

Uma situação sem risco não existe, nem com os agrotóxicos químicos e nem com os AMCs, quanto a isso não se pode absolutamente provar o contrário. O registro de um agrotóxico químico é essencialmente uma autorização de uso, na qual os riscos são aceitáveis, e o mesmo procedimento deve ser aplicado aos AMCs (Oliveira-Filho, 2005).

De acordo com relatório de Glare e O'Callaghan (1998), o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) apresenta um pequeno efeito patogênico a organismos não-alvo, o que inclui invertebrados e vertebrados, entretanto, nesse mesmo relatório os autores enfatizam que o Bt não possui ação direta sobre organismos aquáticos. Também é citado que esse microorganismo não causa efeito contra microcrustáceos da ordem Cladocera, o que contradiz o trabalho de Jonsson e colaboradores (2009), que atribui a redução da sobrevivência destes organismos à exposição de cepas Bt.

Recentemente Oliveira-Filho e colaboradores (2011) constataram os seguintes efeitos adversos, ou a ausência deles, das cepas de Bti e *Bacillus thuringiensis kurstak* (Btk): para *Daphnia similis* não houveram efeitos nas concentrações de $1,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^6$ esporos/mL em 48 horas de exposição; para *Bionphalaria glabrata* na dose de 5×10^7 esporos/mL de Btk não observou-se efeito, para Bti foi calculada a CL_{50} de $1,5 \times 10^7$ esporos/mL em 30 dias de exposição; e para o coleóptero *D. gazella*, a CL_{50} foi de $1,3 \times 10^6$ esporos/grama de esterco fresco para Btk, e $> 1,7 \times 10^6$ esporos/g para Bti.

Assim como foram perceptíveis resultados divergentes neste estudo, na literatura sobre toxicidade de *Bacillus thuringiensis* também existem muitas divergências a respeito de seus efeitos adversos sobre organismos aquáticos. Por exemplo, Jonsson e colaboradores (2009) relacionam a mortalidade de peixes da espécie *Hyphessobrycon scholzei* a exposição deles à cepa 344 de *B. thuringiensis*, numa concentração 1000 vezes maior do que a usada em campo. Em trabalho realizado por Grisolia e colaboradores (2009b) não foi verificada mortalidade em peixes da espécie *D. rerio* e *O. niloticus*, expostos a cepas de Bt na concentração de 5×10^6 , porém encontrou-se efeito citotóxico destas cepas para a segunda espécie de peixe.

Nenhum efeito foi observado em peixes de diferentes espécies expostos ao Bti pulverizado em culturas próximas (Merritt *et al.*, 1989), e em outro estudo também se

verificou a ausência do efeito adverso para peixes expostos a $1,3$ a $1,7 \times 10^{10}$ esporos por grama na dieta desses organismos (Christensen, 1990 *apud* Johnson & McGaughey, 1996).

O protocolo da “United States Environmental Protection Agency” (USEPA, 1996), intitulado como “Microbial Pesticide Tests Guidelines”, 712-C-96 de 1996 preconiza o máximo de células que se deve usar em ensaios com microorganismos, cujo valor pode variar de 10^6 a 10^8 . A quantidade de esporos por mL usados em testes de toxicidade variam conforme a espécie do modelo animal. Sendo que para peixes já foram relatados o uso de 4×10^7 (Carvalho, 2010), 5×10^8 (Günther & Jimenez-Montealegre, 2004), 10^6 e 5×10^6 (Grisolia *et al.*, 2009b) e 10^8 para testes de citototoxicidade (Grisolia *et al.*, 2009b).

Em um estudo anteriormente realizado por nosso grupo de pesquisa (Grisolia *et al.*, 2009b), peixes de duas espécies foram expostos à cepas de Bt (*israelensis* e *kurstak*), nas concentrações de 1×10^6 e 5×10^6 esporos/mL. Uma das espécies utilizadas, *D. rerio*, é comumente usada em ensaios toxicológicos, e a outra, *O. niloticus* (tilápia), geralmente apresenta-se mais resistente do que a primeira em ensaios deste tipo. Todavia, não foram constatadas mortalidade ou qualquer alteração comportamental nestes animais, supondo que a CL_{50} para esses peixes seja maior que as doses utilizadas. Os dois primeiros formulados (Bti e Btk), são cepas de *Bacillus thuringiensis* que produzem entre outras proteínas Cry, Cry10A (Bti), CryII (Btk). Baseando-se nestes resultados foram adotadas concentrações semelhantes de esporo-cristal na metodologia deste trabalho, a fim de comparar os possíveis efeitos adversos dos complexos de esporo-cristal de *Bacillus thuringiensis*.

Sabe-se que a maioria das substâncias químicas, consideradas como agentes tóxicos, são substâncias exógenas aos organismos, conhecidas como xenobióticos. Fatores que influenciam na toxicidade, podem ser de propriedade físico-química, como pH, temperatura, pressão, luminosidade entre outros (Leite & Amorim, 2001). Fatores como o estresse (Lu *et al.*, 2004; Flint *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2011), luminosidade (Aycicek *et al.*, 2008), e exposição a compostos químicos ou microbiológicos (Gomes-Carneiro *et al.*, 1997; Grisolia *et al.*, 2009a; Vilches, 2009; Malla *et al.*, 2011) podem interferir diretamente ou indiretamente sobre o DNA, provocando danos nele.

Tendo em vista o estresse ao qual os animais foram submetidos e os valores altos da amônia total, acredita-se que estes parâmetros, sobretudo a amônia, possam estar envolvidos com os altos índices de danos no DNA, micronúcleo e anomalias cromossômicas, e inclusive com a mortalidade destes animais nos grupos tratados e no controle negativo, cuja amônia atingiu 6,5 mg/L e 3,5 mg/L, respectivamente. Alguns trabalhos relatam o efeito tóxico da

amônia (Silva & Nepomuceno, 2010), sendo esta faixa apresentada crítica para tilápias (Kubitza, 1999; Carvalho, 2010).

A mortalidade de um indivíduo no grupo controle negativo não invalida o estudo e está dentro do esperado, ou seja, 90% de sobrevivência no grupo controle, de acordo com o guia OECD N° 203/1992.

Alguns autores relatam que a amônia é um parâmetro restritivo para peixes, sendo que muitas espécies não sobrevivem a níveis acima de 5 mg/L. Ela provoca o consumo de oxigênio dissolvido das águas naturais ao ser oxidada biologicamente, a chamada DBO de segundo estágio (Vilches, 2009). Por estes motivos, a concentração de nitrogênio amoniacal é importante parâmetro de classificação das águas naturais e normalmente utilizado na constituição de índices de qualidade das águas.

A exposição de peixes à concentrações sub-letais de amônia induz alterações bioquímicas, fisiológicas, histológicas e comportamentais que coletivamente levam à supressão do crescimento e ao comprometimento imunológico (Hargreaves & Kucuk, 2001). Martinez e colaboradores (2006) a julgam como um fator limitante na piscicultura reduzindo a sobrevivência dos peixes, levando a perda do equilíbrio e a morte.

A amônia é o principal produto metabólico nitrogenado e tóxico excretado por peixes, o seu valor pode variar de acordo com a temperatura da água e pH (Yeo *et al.*, 2004; Reis & Mendonça, 2009). De acordo com as resoluções N° 357/2005 e 430/2011 do CONAMA, o valor esperado para amônia com $\text{pH} \leq 7,5$ (valor encontrado em todos os tratamentos) era de 3,7 mg/L para água doce de classe I. Água doce de classe I são aquelas para abastecimento doméstico, recreação, contato, e onde ocorra pesca ou cultivo de organismos, para fins de consumo intensivo (CONAMA, 2005).

Existem indícios de que a atividade microbiana pode transformar a amônia numa forma tóxica intermediária, o nitrito, e ele em nitrato, forma não tóxica (Yeo *et al.*, 2004). Porém este efeito não foi percebido nos experimentos desenvolvidos, possivelmente em virtude do tempo de exposição.

O pH, temperatura e salinidade, mostraram valores normais de acordo com o estabelecido para água doce pela Resolução do CONAMA N° 357 de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005). O oxigênio dissolvido teve uma diminuição gradativa inclusive no grupo controle negativo, cujo esperado segundo a resolução acima, era um valor não inferior a 6 mg/L, enquanto a mínima observada foi de 4 mg/L. Esta diminuição não foi atribuída ao consumo de oxigênio livre pelas bactérias, considerando que a variação entre os grupos tratados e o controle foi de $\pm 0,2$.

A turbidez está relacionada com a transparência da água e o poder de penetração da luz nela. Ela pode ser atingida pela presença de matéria em suspensão na água, como substâncias orgânicas e outras partículas. As matérias orgânicas em suspensão/flutuação podem acumular-se nas guelras ou brânquias causando, por asfixia, a morte dos peixes (Chacon, 1988). Contudo, como o presente trabalho não tem por finalidade análises histológicas, não puderam ser atribuídas estas características aos peixes que morreram ao longo do experimento.

Uma vez que as excretas dos peixes expostos, assim como os resíduos de ração oferecidos uma vez ao dia, tendem a se acumular nos aquários, desprovidos de filtro, o aumento da turbidez no grupo controle negativo, foi conforme esperado. Em contrapartida, a diminuição da turbidez nos grupos tratados significa que o material diluído na água do aquário, por mais que tenha contado com o auxílio da aeração constante, e movimentação dos animais, foi sedimentando ao longo de 96 horas de exposição. Porém, os valores para turbidez se mantiveram no máximo permitido pela Resolução CONAMA Nº 357/2005, 40 UNT (unidades nefelométricas de turbidez) sendo que a máxima no início da exposição foi de 30 UNT e no final foi de 11 UNT.

Sabe-se que o estresse em peixes direciona distúrbios endócrinos com efeitos metabólicos que podem incluir hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, lipólise e inibição da síntese proteica (Martinez *et al.*, 2006). Por isso acredita-se que este pode ter sido mais um fator de interferência nos resultados encontrados, podendo ter agido diretamente, ou indiretamente, na alta incidência de danos no DNA das tilápias, conforme ilustrados nos resultados dos grupos tratados e no controle negativo.

Pelo teste do cometa, percebeu-se que apenas as concentrações de 25 e 100 mg/L do complexo esporo-cristal recombinante de Cry1Ia apresentaram índice de danos moderados no DNA estatisticamente significativo em relação ao respectivo controle. Para os danos elevados no DNA, às três concentrações não foram estatisticamente significativas, o que pode sugerir uma tendência genotóxica. Porém, tais dados não são suficientes para afirmar que esse esporo-cristal apresente genotoxicidade para peixes.

Pouco ainda se sabe sobre os receptores de membrana das proteínas utilizadas neste trabalho. Contudo, Martins (2009) relatou duas proteínas do grupo das fosfatases alcalinas como prováveis receptores para Cry1Ba6, e polipeptídeos (no caso do receptor ser de natureza proteica) como prováveis receptores para as proteínas recombinantes Cry1Ia e Cry10Aa.

Com exceção da proteína Cry3 (Li *et al.*, 1991), as proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* se solubilizam em pH alcalino, acima de 9,5 (Knowles & Dow, 1993, Martins,

2009). De acordo com Rotta (2003), a maioria dos peixes possuem pH do estômago extremamente ácido, no caso da tilápia nilótica o pH varia de 1,4 a 1,6, porém apresentam um muco alcalino que reveste a parede estomacal, e também contam com a presença de proteases. Estas proteases são de origem tanto pancreática quanto intestinal, sendo as intestinais presentes: exopeptidases; dipeptidases; catepsina; tripsina (ativada entre pH 7 e 11). Algumas espécies de peixes sem estômago possuem pH de todo o trato digestivo alcalino (Rotta, 2003), porém, este não é caso da tilápia.

As diferenças significativas na mesma concentração, comparando diferentes esporos-cristais, observadas pelo teste do cometa, sugere que os esporos-cristais de Cry1Ia podem apresentar riscos que os esporos-cristais de Cry1Ba6 e Cry10Aa, não apresentam mesmo em concentrações maiores.

Em um estudo realizado por Grisolia e colaboradores (2009a), foram testados quatro esporos-cristais de estirpes recombinantes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A) em peixes da espécie *D. rerio*, e foi verificado que apenas o complexo esporo-cristal Cry1Aa induziu MN em sangue periférico esses resultados corroboram os dados obtidos neste trabalho.

Além do mais, os mesmos efeitos genotóxicos observados pelo teste do cometa, que detecta lesões genômicas, que ainda são passíveis de correção (Gontijo & Tice, 2003), não foram observados no teste do micronúcleo, que por sua vez detecta danos cromossômicos ou no aparelho mitótico (Salvadori *et al.*, 2003), o que leva a acreditar que os efeitos genotóxicos do complexo esporo-cristal Cry1Ia, observados pelo teste do cometa, ainda possam ser reparados pelo sistema de reparo desse organismo. Com isso, sugere-se que sejam realizados períodos de recuperação, onde ocorre a troca da água do sistema por água filtrada e tratada, a fim de verificar se de fato a genotoxicidade observada para Cry1Ia pelo teste do cometa seria também observada no teste do micronúcleo.

Esta divergência de resultados apresentados em testes de avaliação toxicológica já foi observada em diferentes artigos que avaliam o potencial tóxico dessas substâncias. No trabalho de Ren e colaboradores (2002), o bioinseticida Bt foi capaz de induzir aberrações cromossômicas, como quebras de cromátides e de cromossomos, em células germinativas do ortoptera *Oxya chinensis*, em contrapartida, os cristais do *Bacillus thuringiensis* sorotipo H-1 e H-14 não apresentam genotoxicidade através do ensaio da *Salmonella* (Teste de Ames) em um estudo realizado Carlberg e colaboradores em 1995.

Sabe-se que os esporos possuem atividade sinérgica com as proteínas Cry, sendo elas mais tóxicas quando em ação conjunta (Johnson & McGauey, 1996). As medições de

toxicidade com base na concentração de esporos nem sempre são confiáveis, uma vez que o componente tóxico das formulações Bt é a δ -endotoxina (Glare & O'Callaghan, 1998).

5.2 Camundongos

Testes de segurança já comprovaram um baixo risco a mamíferos expostos diretamente a Bt. A preocupação relacionada a mamíferos está no fato de que já foram constatados que solubilizados de δ -endotoxinas, via injeção, se mostraram tóxicos a camundongos, e esse solubilizado também foi citolítico para eritrócitos humanos (Glare & O'Callaghan, 1998).

Todavia, muitos trabalhadores de campo expostos à aplicações de produtos à base de Bt, não vêm por que suspender o uso destes produtos em termos de risco à saúde (WHO, 1992). Estudos realizados em ratos, que receberam 2×10^{12} esporos/Kg, e em humanos que ingeriram voluntariamente 3×10^9 esporos viáveis por cinco dias não apresentaram efeitos de toxicidade (Fisher & Rosner, 1959 apud Drobniewski, 1994).

Em estudo publicado recentemente (Aris & Leblanc, 2011), foi detectada a presença de metabolitos da proteína Cry1Ab, em mulheres grávidas, em seus fetos e em mulheres não grávidas, em virtude da exposição a alimentos transgênicos. Em contrapartida, não foram detectadas diferenças nos metabolitos da urina de ratos alimentados com arroz-Bt e arroz de cultura normal em longo prazo (Cao *et al.*, 2011).

De acordo com Ribeiro (2003), os MN podem ser alternativamente detectados em eritrócitos normocromáticos circulantes (NCE), uma vez que ao contrário do baço de rato e do homem, o baço de camundongo não remove do sangue os eritrócitos contendo micronúcleos.

Conforme os resultados obtidos, apenas os esporos-cristais de Cry10Aa na menor concentração apresentaram efeito sobre a linhagem medular celular. Acredita-se que este efeito perceptível apenas na menor dose de Cry10Aa (1×10^9) também esteja relacionado a um valor com efeito estatisticamente significativo, mas sem significado biológico.

De acordo com Campbell (2007) é difícil obter valores de confiança para hemograma, devido às variações relacionadas ao procedimento de coleta do sangue aos fatores ambientais e aos procedimentos laboratoriais envolvidos. Em geral, a coleta do sangue causa estresse, ou requer contenção química, fatores como o sexo, idade, anestesia, linhagem e método de contenção fazem com que existam variações neste parâmetro.

Os valores da hemoglobina corpuscular média (HCM) do grupo controle negativo e de todos os grupos tratados estão dentro dos padrões apresentados para camundongos, 13,7 -18,1 pg (Campbell, 2007), ou seja, por mais que os grupos tratados tenham apresentado diminuição significativa em relação ao controle negativo, os valores estão dentro dos limites aceitáveis para estes organismos. A diminuição nos valores de CHCM (concentração hemoglobínica corpuscular média) indica uma hipocromia dessas células, verificada por um valor abaixo do padrão normal (Meyer *et al.*, 1995). Os valores para volume corpuscular médio (VCM), que se referem ao tamanho da célula, foram abaixo do esperado para camundongos, 42,3 – 55,9 fL (Campbell, 2007), tanto no grupo controle negativo quanto nos tratados, o que pode sugerir células microcíticas, que são células com tamanho abaixo do normal (Meyer *et al.*, 1995). O valor da RDW (distribuição espacial das células vermelhas) é deduzido como uma representação numérica da anisocitose, que é a variação do tamanho dos eritrócitos (Meyer *et al.*, 1995). Tendo em vista que VCM está relacionado à RDW, um RDW aumentado indica a presença de subpopulações de eritrócitos, maiores, menores ou uma combinação. Com isso, uma baixa VCM pode estar associada a eritrócitos menores (Meyer *et al.*, 1995).

Nos resultados de leucograma não foram observadas diferenças significativas no número de linfócitos e os valores ficaram dentro do esperado para camundongo, $1,27 - 8,44 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Campbell, 2007), entretanto, as variações observadas em linfócitos (%) e em neutrófilos + monócitos, podem sugerir respostas do sistema imunológico, que pode ser desde uma resposta a uma hipersensibilidade tardia ao complexo espora-cristal, assim como um mecanismo de defesa contra microorganismos, podendo estar ligado a processos inflamatórios ou não (Meyer *et al.*, 1995).

Com relação a análise do volume plaquetário médio (VPM), o aumento significativo observado em todos os tratamentos em relação ao grupo controle, com exceção de um (Cry1Ba6 a 27 mg/Kg), tem sido atribuído à redução da sobrevivência das plaquetas (Grotto, 1998), a heterogeneidade e maturidade da população de megacariócitos da medula óssea, ao sequestro periférico das plaquetas pelo baço, e a destruição delas pelo sistema imunológico (Comar & Silva, 2009). Todavia, plaquetas maiores são mais ativas que as menores, assim como plaquetas novas em relação às velhas (Thompson *et al.*, 1983; Comar & Silva, 2009). Essa afirmativa pode sugerir uma base explicativa para o aumento observado em P-LCR (porcentagem de plaquetas gigantes), uma vez que houve aumento destas plaquetas gigantes, acredita-se que em virtude de algum efeito adverso ocasionado pelo complexo espora-cristal, elas tenham sido mais ativas conforme sugere os dados da literatura (Thompson *et al.*, 1983; Comar & Silva, 2009). Em análise conjunta, o aumento observado em PDW (variação da

distribuição do tamanho das plaquetas) em alguns grupos tratados, pode indicar a afirmativa anterior como verdadeira, tendo em vista que o PDW está diretamente relacionado ao aumento da heterogeneidade do volume plaquetário (Comar & Silva, 2009).

Todavia, Meyer e colaboradores (1995), enfatiza que os índices apresentados em análise de hemograma são sinais grosseiros de alterações e, quando anormais, determinam que investigações mais apuradas devam ser realizadas.

Neste contexto, vale ressaltar que os valores de esporos viáveis usados nos ensaios foram muito maiores que os usados em campo. Sendo que em campo a dose máxima utilizada do bioinseticida Dipel, à base de Bt, é para a cultura de Citros, no combate ao lepidóptero bicho-furão (*Gymnandrosoma aurantiana*), onde é aplicado do princípio ativo cerca de $6,93 \times 10^8$ esporos viáveis por hectare, enquanto que nos testes realizados a concentração máxima usada foi de 10^{10} esporos/Kg em camundongos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Num contexto abrangente o complexo esporo-cristal de estirpes recombinantes de Cry1Ba6 e Cry10Aa não foram genotóxicos para peixes. Apenas o esporo-cristal Cry1Ia apresentou tendência genotóxica para danos moderados, o que remete a outros ensaios. Para camundongos, esses complexos de esporos-cristais não apresentaram genotoxicidade e citotoxicidade de acordo com os testes realizados.

Pequenas alterações detectadas nas análises hematológicas de camundongos remetem a propor estudos mais detalhados a fim de esclarecer possíveis causas dessas alterações. Neste contexto, sugere-se que estudos de ligação à membrana de células intestinais de peixes e de camundongos sejam realizados com purificados de proteínas Cry, a fim de verificar se de fato existem receptores nesses organismos para estas proteínas-cristais, assim como a verificação do efeito do esporo em estirpes recombinantes.

Além do mais, o risco tóxico constitui a probabilidade de uma substância produzir um efeito adverso, um dano, em condições específicas de uso, e os valores de esporos-cristais utilizados nos ensaios foram muito maiores que os utilizados em campo.

Baseando-se no contexto bibliográfico e nos resultados encontrados, acredita-se que os efeitos observados estão mais relacionados ao tipo de produto Bt (esporo-cristal, cepa, formulado, proteínas), à via de exposição ou administração, e à concentração de exposição aos quais os animais são submetidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R.W.S. **Estudo da Toxicidade de Proteínas Cry Recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, Utilizando o Sistema de Expressão Baseado em Baculovírus e Células de Inseto**. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, UnB, 2007.

ALI, F. K.; EL-SHEHAWI, A.M.; SEEHY, M.A. Micronucleus Test in Fish Genome: A Sensitive Monitor for Aquatic Pollution. **Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 606-612, 2008.

ALMEIDA, M.R. **Estudo Citogenético em Camundongos C57BL/6 Selvagens e Knockout para o gene da Galectina-3 Tratados com o Carcinógeno 4NQO**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Uberlândia, 2008.

ALVES, L.F.A.; FILHO, A.B. Formulação de Entomopatógenos. Uma boa formulação é a base para o sucesso de um inseticida microbiano. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, v.5, p.32-34, 1998.

ALVES, S. B.; MORAES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, p. 765-778, 1998.

ALVES FILHO, J. P. Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos. Editora Annablume, 1ª Edição, São Paulo – SP. 2002.

ALVES, R.T.; SILVA, E.A.F.; SOUSA, K.M. ; OLIVEIRA, M.A.S.; PEREIRA, F.B.C.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ICUMA, I.M. Controle Biológico do Percevejo-de-renda da Seringueira com o Uso de Micoinseticida Formulado em Óleo Emulsionável. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Pesquisa Brasileira de Agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.1-22, 2003.

ALVES, R.T. Produção, Formulação e Aplicação de Fungos para o Controle de Pragas. In: OLIVEIRA-FILGO, E.C.; MONNERAT, R.;G. (Eds.) **Fundamento para a Regulamentação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 239- 253, 2006.

ALVES, V.E.; CABRAL, J.H.C.; RESENDE, M.R.; FLORÊNCIO, D.; DA SILVA, J.J.; BASSI, R.C.; COSTA, A.M.D.D.; FIORINI, J.E.; DA SILVA, L.M.; LOPES, J.R.G.; NOGUEIRA, D.A.; BORIOLLO, M.F.G. Comparação da Mutagenicidade Entre Eritrócitos Policromáticos (Medula Óssea) e Normocromáticos (Sangue Periférico) Micronucleados Obtidos no Teste do Micronúcleo em Roedores *in vivo*. **Anais do VII Confarma**, Alfenas – MG, 2008.

ALY, N.A.H. PCR Detection of *cry* Genes in Local *Bacillus thuringiensis* Isolates. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 1, p. 461-466, 2007.

ANDRADE, S.R.M.; FALEIRO, F.G. Biossegurança Ambiental e Alimentar de OGMs. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JÚNIOR, F.B. (Eds.) **Biociência: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 469-508, 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Reavaliação dos agrotóxicos: 10 anos de proteção a população**. Brasília, DF. Publicado em 2 de abril 2009.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Esclarecimento sobre o “Parágrafo 26” do Protocolo OECD 474 – Teste de Micronúcleo em Eritrócitos de Mamíferos.** Publicado em 16 de agosto 2010. Brasília, DF, 2010a.

ARIAS, D.M.; RIESEBERG, L.H. Gene Flow Between Cultivated and Wild Sunflowers. **Theor Appl Genet.**, v. 89, p. 655-660, 1994.

ARIS, A.; LEBLANC, S. Maternal and Fetal Exposure to Pesticides Associated to Genetically Modified Foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. **Reproductive Toxicology**, v. 31, p. 528-533, 2011.

ARONSON, A.I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and Related Insect Pathogens. **Microbiological Reviews**, v. 50, p.1-24, 1986.

AYCICEK, A.; KOCYGIT, A.; EREL, O.; SENTURCK, H. Phototherapy Causes DN Damage in Peripheral Mononuclear Leukocytes in Term Infants. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. 141-146, 2008.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in European Minnow *Phoxinus phoxinus* and Mollie *Poecilia latipinna*: na assessment of the Fish Micronucleus Test. **Mutation Research**, v. 467, p. 177-186, 2000.

AVMA. American Veterinary Medical Association, Guidelines on Euthanasia, 2007.

BALOI, M.A.; LAING, M.D.; YOBO, K.S. Use of Mixed Cultures of Biocontrol Agents to Control Sheep Nematodes, **Veterinary Parasitology**, Sep. 12, 2011.

BARTON, K.; WHITELEY, H.; YANG, N.S. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins in Transgenic *Nicotiana tabacum* Provides Resistance to Lepidopteran Insects. **Plant Physiology**, v. 85, p. 1103-1109, 1987.

BATISTA, A.; MELATTI, V.; DEMO, C.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; BROD, C.; MONNERAT, R.G. Prospecção de Estipes de *Bacillus thuringiensis* Tóxicas a *Spodoptera frugiperda*. **Boletim de Desenvolvimento** 81, Embrapa, 2005.

BENIGNI, R.; BOSSA, C.; WORTH, A. Structural Analysis and Predictive Value of the Rodent *in vivo* Micronucleus Assay Results. **Mutagenesis**, v. 25, p. 335-341, 2010.

BESPALHOK-FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Laranja Transgênica. **Biociência**, v. 1, p. 62 – 66, 2001.

BIZZARD, B.L.; WHITELET, H.R. Nucleotide Sequence of an Additional Crystal Protein Gene Cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. **Nuclei Acids Research**, v. 16, pp. 2723-2724, 1988.

BLAIR, A.; FREEMAN, L.B. Epidemiologic Studies of Cancer in Agricultural Populations: Observations and Future Directions. **J. Agromedicine**, v. 12, p. 125-131. 2009.

BLOOM, J.C.; BRANDT, J.T. Toxic Responses of the Blood. In: CASARET.; DOULLS'S. Toxicology – The Basic Science of Poisons. Ed. Mcgraw-Hill, p. 454-484, 2008.

BOISVERT, M.; BOISVERT, J. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *isaraelensis* on Target and Nontarget Organisms: a Review of Laboratory and Field Experiments. **Biocontrol Science and Techonology**, vol. 10, p. 517-561, 2000.

BOLOGNESI, C.; CREUS, A.; WEGMAN, P.O.; MARCOS, R. Micronuclei and Pesticide Exposure. **Mutagenesis**, v. 26, p. 19-26, 2011.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus Assay in Aquatic Animals. **Mutagenesis**, v. 26, p. 205-213, 2011.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário Oficial da União, 12 de julho de 1989.

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação quanto aos alimentos e ingredientes alimentares que contenham ou sejam produzidos de organismos geneticamente modificado, 28 de abril de 2003.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 8 de janeiro de 2004. Regulamenta a Lei nº 7.802/89. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em 12 de setembro de 2011, 2004.

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm>. Acesso em 16 de novembro de 2011. 2005a.

BRASIL. Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005. Regulamenta dispositivos da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005 e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5591.htm>. Acesso em: 16 de novembro de 2011, 2005b.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta nº 03, de 10 de março de 2006. Disponível em: <<http://www.aenda.org.br/Legislacao/InConj03-06.pdf?>>. Acesso em 12 de setembro de 2011, 2006a.

BRASIL. Decreto nº 5.950, de 31 de outubro de 2006. Regula o art. 57 da Lei nº 9.985/2000 que estabelece limites para o plantio de organismos geneticamente modificados, 31 de outubro de 2006b.

BRASIL. Medida Provisória nº 327, de 31 de outubro de 2006. Dispõe sobre o plantio de organismos geneticamente modificados em unidades de conservação, 31 de outubro de 2006c.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais, 8 de outubro de 2008.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 12, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERON, M. Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt Toxins and Their Potential for Insect Control. **Toxicon.**, v.49, p. 423-435, 2007.

BREITLER, J.C.; CORDERO, M.J.; ROYER, M.; MEYNARD, D.; SAN SEGUNDO, B.; GUIDERDONI, E. The -689/+197 Region of the Maize Protease Inhibitor Gene Directs High Level, Wound-Inducible Expression of the *cry1B* Gene Which Protects Transgenic Rice Plants from Stemborer Attack. **Molecular Breeding**, v. 7, p. 259-274, 2001.

BRITO, L.G.; NETTO, F.G.S.; ROCHA, R.B. Controle Integrado da Mosca-do-Chifre para a Microrregião de Ji-Paraná, Rondônia. **Comunicado Técnico 327**, Embrapa, 2007.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da Mutagênese e Genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) Expostos ao Benzeno. **Acta Amazônica**, v. 36, p. 357-364, 2006.

BUENO, A.M.; AGOSTINI, J.M.A. Estabelecimento de Um Controle Histórico da Frequência de Eritrócitos Micronucleados em Camundongos da Linhagem SWISS, do Biotério Central da UFSC. **Relatório Final** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BULL, C.F.; HILL, S.B.; EVANS, B.J.B.; CROTT, J.W.; KIMURA, M.; TEO, T.; WU, J.; FENECH, M.F. Application and Adaptation of the *in vitro* Micronucleus Assay for the Assessment of Nutritional Requirements of Cells for DNA Damage Prevention. **Mutagenesis**, v. 26, 193-197, 2011.

CALHEIROS, R.O et al. Preservação e Recuperação das Nascentes. Piracicaba: Comitê das Bacias Hidrográficas, 2004.

CAMPBELL, T.W. Hematologia de Mamíferos: Animais de Laboratório e Espécies Variadas. In: BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.; LASSE, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G (Eds.) Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Ed. ROCA. p. 201-214, 2007.

CAO, J.; ZHAO, J. Z.; TANG, J. D.; SHELTON, A. M. Broccoli Plants With Pyramided *cry* 1Ac and *cry* 1C Bt Genes Control Diamondback Moths Resistant to *cry* 1A and *cry* 1C Proteins. **Theor Appl Genet**, v. 105, p. 258-264, 2002.

CAO, S.; XU, W.; LUO, Y.; HE, X.; YUAN, Y.; RAN, W.; LIANG, L.; HUANG, K. Metabonomics Study of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Rice (T2A-1) Meal in a 90-Day Dietary Toxicity Study in Rats. **Molecular BioSystems**, v. 7, p. 2304-2310, 2011.

CARLBERG, G.; TIKKANEN, L.; ABEL-HAMEED, A. Safety Testing of *Bacillus thuringiensis* Preparations, Including *thuringiensin*, Using the *Salmonella* Assay. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 66, p.68-71, 1995.

CARMONA, D.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; MUÑOZ-GARAY, C.; PORTUGAL, L.; PÉREZ, C.; MAAGD, R.A.; BAKKER, P.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Dominant Negative Phenotype of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab, Caary11Aa and Cry4Ba Mutants Suggest Hetero-Oligomer Formation Among Different Cry Toxins. **Plosone**, v. 6, p. 1-6, 2011.

CARVALHO, R.S. **Biocontrole de Moscas das Frutas: Histórico, Conceitos e Estratégias**. Circular técnica 83. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

CARVALHO, J.V. **Mananoligossacarídeo e *Bacillus subtilis* na Alimentação de Alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

CASTRO, V.L.S.S. Aspectos da Exposição Ambiental aos Agroquímicos no Desenvolvimento Animal, **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 21, p. 469-497, 2004.

ÇAVAS, T.; GÖZÜKARA, S.E. Genotoxicity Evaluation of Metronidazole Using the Piscine Micronucleus Test by Acridine Orange Fluorescent Staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p.197-111, 2005.

ÇAVAS, T. In vivo Genotoxicity of Mercury Chloride and Lead Acetate: Micronucleus Test on Acridine Orange Stained Fish Cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 352-358, 2008.

ÇELIK, A.; ÖGENLER, O.; ÇÖMELEKOGLU, U. The Evaluation of Micronucleus Frequency by Acridine Orange Fluorescent Staining in Peripheral Blood of Rats Treated with Lead Acetate. **Mutagenesis**, v. 20, p. 411-415, 2005.

CHACON, J.O. Adaptação de Açudes para a Piscicultura. In: FAO. Manual Sobre Manejo de Reservatórios Para a Produção de Peixes. Brasília, 1988.

CHAIM, A.; MAIA, A.H.N.; PESSOA, M.C.P.Y. Estimativa da Deposição de Agrotóxicos por Análise de Gotas, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.6, p.963-969, 1999.

CHAIMOVICH, H. Tendências/Debates. **Folha de São Paulo**, p. 3, 2003.

COLLINS, A.R.; AI-GUO.; DUTHIE, S.J. The Kinetics of Repair of Oxidative DNA Damage (Strand Breaks and Oxidised Pyrimidines) in Human Cells. **Mutation Research**, v. 336, p. 69-77, 1995.

COMAR, S.R.; SILVA, P.H. Determinação Laboratorial e Aplicação Clínica dos Parâmetros de Volume Plaquetário. **RBAC**, v. 41, p. 257-265, 2009.

CONAMA. Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento.

CONAMA. Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA Nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes.

COSTA, J.R.V.; ROSSI, J.R.; MARUCCI, S.C.; ALVES, E.C.C.; VOLPE, H.X.L.; FERRAUDO, A.S.; LEMOS, M.V.F.; DESIDERIO, J.N. Atividade tóxica de Isolados de *Bacillus thuringiensis* a Larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Díptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, 2010.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p. 807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D.H. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature" (2011) Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt>. Acesso em 21 de novembro de 2011.

CRONKITE, E.P.; DREW, R.T.; INOUE, T.; HIRABAYASHI, Y.; BULLIS, J.E. Hematotoxicity and Carcinogenicity of Inhaled Benzene. **Environmental Health Perspectives**, v. 82, p. 97-108, 1989.

DAVID, J.A.O.; HOSHINA, M.M. FONTANETTI, C.S. DNA Damage in *Mytella falcata* (Mytiloidea, Mytilidae) Cells: A New Tool for Biomonitoring Studies in Tropical Estuarine Ecosystems. **Naturalia**, v. 31, p. 8-15, 2008.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de Classification Biochimique et Sérologique de 24 Souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, Paris, v. 7, p. 5-31, 1962.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has Evolved Specific Toxins to Colonize the Insect World. **TRENDS in Genetics**, v. 17, p. 193-199, 2001.

DELECLUSE, A.; BOURGOUIN, C.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Specificity of Action on Mosquito Larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* Toxins Encoded by Two Different Genes. **Mol. Gen. Genet.**, v. 214, p. 42-47, 1988.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet Assay: a Reliable Tool for the Assesment of DNA Damae in Different Models. **Cell Biol Toxicology**, v. 25, p. 5-32, 2009.

DIAS, J.M.C.S. Produção e Utilização de Bioinseticidas Bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.7, p. 59-76, 1992.

DOUVILLE, M.; GAGNÉ, F.; MASSON, L.; MCKAY, J.; BLAISE, C. Tracking the Source of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Endotoxin in the Environment. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 219-232, 2006.

DOUVILLE, M.; GAGNÉ, F.; ANDRÉ, C.; BLAISE, C. Occurrence of the Transgenic Corn *cry1Ab* Gene in Freshwater Mussels (*Elliptio complanata*) Near Corn Fields: Evidence of Exposure by Bacterial Ingestion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 17-25, 2009.

DROBNIIEWSKI, F.A. The Safety of *Bacillus thuringiensis* Species as Insect Vector Control Agents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 101-109, 1994.

DULMAGE, H.T Insecticidal Activity of HD-1, a New Isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.15, p. 232-239, 1970.

ENNACEUR, S.; RIDHA, D.; MARCOS, R. Genotoxicity of the Organochloride Pesticides 1,1-dichloro - 2,2-bis (p-chlorophenyl) ethylene (DDE) and hexachlorobenzene (HCB) in Cultured Human Lymphocytes. **Chemosphere**, v.71, p. 1335-1339, 2008.

ERBAN, T.; NESVORNA, M.; ERBANOVA, M.; HUBERT, J. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* Control of *Synanthropic mites* (Acari: Acaridida) under Laboratory Conditions. **Experimental & Applied Acarology**, n. 49, v.4. p. 339-346, 2009.

ESPINASSE, S.; GOHAR, M.; CHAUFAX, J.; BUISSON, C.; PERCHAT, S.; SANCHIS, V. Correspondence of High Levels of Beta-Exotoxin I and the Presence of *cry1B* in *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4182-4186, 2002.

FARIA, N.M.X.; FASSA, A.G.; FACCHINI, L.A. Intoxicação por Agrotóxicos no Brasil: os Sistemas Oficiais de Informação e Desafios para Realização de Estudos Epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 25-28, 2007.

FENECH, M. The *in vitro* Micronucleus Techique. **Mutation Research**, v. 455, pag. 81-95, 2000.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; ZEIGER, E.; CHANG, W.P.; BURGAS, S.; THOMAS, P.; BOLOGNESI, C.; KNASMUELLER, S.; VOLDERS, M.K.; BONASSI, S. The HUMN and HUMN_{XL} International Collaboration Projects on Human Micronucleus Assays in Lymphocytes and Buccal Cells – Past, Present and Future. **Mutagenesis**, v. 26, p. 239-245, 2011.

FIOCRUZ. Ministério da Saúde. **Manual de Utilização de Animais/Fiocruz**. 2008.

FLINT, M.S.; BAUM, A.; CHAMVERS, W.H.; JENKINS, F.J. Induction of DNA Damage, Alteration of DNA Repair and Transcriptional Activation by Stress Hormones. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 470-479, 2007.

FRANKENHUYZEN, K.V. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 1-16, 2009.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Endotoxins. **Annual Reviews Entomology**, v. 37, p.617-636, 1992.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. Report for the Ministry of Health. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Biocontrol & Biodiversity, Grasslands Division, AgResearch**, 1998.

GOLDSTEIN, B. D. Hematopoietic and Lymphatic System. International Labour Office. **Encyclopaedia of Occupational Health and Safety**, v. 1, p. 12-19, 1998.

GOMES-CARNEIRO, M.R.; RIBERO-PINTO, L.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Fatores de Risco Ambientais para o Câncer Gástrico: a Visão Toxicologista. **Cad. Saúde Publ.** v. 13, p. 27-38, 1997.

GOMEZ, I.; LOPEZ, L.P.; MUNOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L.E.; PEREZ, C.; SANCHEZ, J.; SOBERON, M.; BRAVO. Role of Receptor Interaction in the Mode of Action of Insecticidal Cry and Cyt Toxins Produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, v. 28, p. 169-173, 2007.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do Cometa para a Detecção de Dano no DNA e Reparo em Células Individualizadas. . In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.) Mutagênese Ambiental. Canos, RS: Ed. ULBRA. p. 247-279, 2003.

GRISOLIA, C.K. A Comparison Between Mouse and Fish Micronucleus Test Using Cyclophosphamide, Mitomycin C and Various Pesticides. **Mutation Research**, v. 518, p. 145-150, 2002.

GRISOLIA, C.K. Agrotóxicos - Mutações, Câncer & Reprodução: Riscos ao Homem e ao Meio Ambiente, pela Avaliação de Genotoxicidade, Carcinogenicidade e Efeitos Sobre a Reprodução. Editora UnB, 2005.

GRISOLIA, C. K.; OLIVEIRA, R.; DOMINGUES, I.; OLIVEIRA-FILHO, E, C.; MONNERAT, R.G.; SOARES, A. V. M. Genotoxic Evaluation of Different δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on Zebrafish Adults and Development in Early Life Cycle. **Mutation Research**, v. 672, p. 119-123, 2009a.

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA-FILHO, E, C.; RAMOS, F.R.; LOPES, .C.; MUNIZ, D.H.F.; MONNERAT. Acute Toxicity and Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* Strains on Fish and Mouse Bone Marrow. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 22-26, 2009b.

GROTTO, H.Z.M. Perfil Plaquetário de um Grupo de Pacientes HIV+. Valor do VPM na Análise da Plaquetopenia. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 34, p. 74-78, 1998.

GUIMARÃES, C.O.; CORREIA, A.C.B.; FERREIRA, M.C. Pressão de Aplicação com Pulverizador de Barra e Eficiência de Bioinseticidas Fúngicos Comerciais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.12, p. 1177-1182, 2004.

GÜNTHER, J.; JIMENEZ-MONTEALEGRE, R. Efeito Del Probiótico *Bacillus subtilis* Sobre Eel Crescimento y Alimentación de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) e Langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) em Laboratório. **Ver. Biol. Trio.**, v. 52, p. 937-943, 2004.

GUO, S.; ZHANG, C.; LIN, X.; ZHAN, Y.; HE, K.; SONG, F.; ZHANG, J. Purification of an Active Fragment of CryIIe Toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Protein Expression and Purification**, v. 78, p.204-208, 2011.

HANDEL, C.L.; MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C. Riscos e Benefícios do Uso de Plantas Transgênicas na Agricultura. **Ciência Rural**, v.26, n.3, p. 511-517, 1996.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, L.; DELÉCLUSE, A.; LEROUX, C.N. (Ed.), **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Klumer Academic Publishers, p.41-64, 2000.

HARA, M.R.; KOVACS, J.J.; WHALEN, E.J.; RAJAGOPAL, S.; STRACHAN, R.T.; GRANT, W.; TOWERS, A.J.; WILLIAMS, B.; LAM, C.L.; XIAO, K.; SHENOY, S.K.; GREGORY, S.G.; AHN, S.; DUCKETT, D.R.; LEFKOWITZ, R.J. A Stress Response Pathway Regulates DNA Damage Through β_2 -adrenoreceptors and β -arretin-1. **Nature**, doi:10.1038/nature10368, 2011.

HARGREAVES, J.A.; KUCUK, S. Effects of Diel Un-Ionized Ammonia Fluctuations on Juvenile Hybrid Striped Bass, Channel Catfish, and Blue Tilapia. **Aquaculture**, v. 195, p. 163-181, 2001.

HERNANDEZ-SOTO, A.; DEL RINCÓN-CASTRO, M.C.; ESPINOZE, A.M.; INARRA, J.E. Parasporal Body Formation via Overexpression of the Cry10Aa Toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Cry10Aa-Cyt1Aa Synergism. **Appl. Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4661-4667, 2009.

HILDER, V. A. GM Plants and Protection Against Insects – Alternatives Strategies Based on Gene Technology. **Acta Agriculture Scandinavica**, v. 53, p. 34-40, 2003.

HILL, C.A.; PINNOCK, D.E. Histopathological Effects of *Bacillus thuringiensis* on the Alimentary Canal of the Sheep Louse, *Bovicola ovis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 9-20, 1998.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; RIE, J.V.; JANSSENS, S.; MELLAERT, H.V. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is Correlated With the Presence of High-Affinity Binding Sites in the Brush Border Membrane of Target Insect Midguts. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

ISHIZUKA, M.; FUJIMOTO, Y.; ITOH, Y.; KITAGAWA, K.; SANO, M.; MIYAGAWA, Y.; ANDO, A.; HIRAMATSU, M.; HIRASAWA, N.; ISHIHARA, S.; NAKASHIMA, T.; YAMADA, K. Relationship Between Hematotoxicity and Serum Albumin Level in the Treatment of Head and Neck Cancers with Concurrent Chemoradiotherapy Using Cisplatin. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 41, p. 973-979, 2011.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information Into DNA of Simian virus 40: circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and Galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 69, p. 2904-2909, 1972.

JALOSYÉSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-SWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J.; SZYFTER, K. Bleomycin-Induced DNA damage and Its Removal in Lymphocytes of Breast Cancer Patients Studied by Comet Assay. **Mutation Research**, v. 385, p. 223-233, 1997.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2010. **ISAAA Brief**. ISAAA, 2010.

JOHNSON, D.E.; MCGAUGHEY, W.H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* Spore to Toxicity of Purified Cry Protein Towards Indianmeal Moth Larvae. **Current Microbiology**, v.33. p. 54-50, 1996.

JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; CAPALBO, D.; CARBALLO-HONDAL, O. **Avaliação de Risco do Biopesticida *Bacillus thuringiensis* (Cepa 344) em Organismos Bioindicadores Presentes em Sistemas de Reprodução Aquícola**. In: Zootec 2009, Águas de Lindóia. Anais, 2009.

KATZ, I. S.S. **Hematotoxicidade por Xenobióticos do Tipo Hidrocarbonetos Aromáticos em Camundongos Airmax e Airmin**. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, 2007.

KIM, H. S.; YAMASHITA, S.; AKAO, T.; SAITOH, H.; HUGUCHI, K.; PARK, Y. S.; MIZUKI, E.; OHBA, M. *In vitro* Cytotoxicity of non-Cyt Inclusion Proteins of a *Bacillus thuringiensis* Isolate Against Human Cells, Including Cancer Cells. **J Appl Microbiol**, v. 89, p. 16-23, 2000.

KNOWLES, B.H.; DOW, J.A.T. The Crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for Their Mechanism of Action on the Insect Gut. **BioEssays**, v. 15, p. 469-476, 1993.

KOLLER, C.N.; BAUER, L.S.; HOLLINGWORTH, R.M. Characterization of the pH-Mediated Solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san siego* Native δ - Endotoxin Crystals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 184, p. 692-699, 1992.

KOTZE, A.C.; GRADY, J.O.; GOUGH, J.M.; PEARSON, R.; BAGNALL, N.H. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Parasitic and Free-Living Life-Stages of Nematode Parasites of Livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1013-1022, 2005.

KRÜGER, R.A. **Análise da Toxicidade e da Genotoxicidade de Agrotóxicos Utilizados na Agricultura Utilizando Bioensaios com *Allium cepa***. Dissertação de mestrado – Centro Universitário Feevale, Nova Hamburgo, 2009.

KUBITZA, F. O Uso da Metiltestosterona na Masculinização de Tilapias: um Desafio para o MPA. **Panorama da Aquicultura**, v. 19, p. 14-21, 2009.

KUMARI, S.; RASTOGI, R. P.; SINGH, K. L.; SINGH, S. P.; SINHA, R.P. DNA Damage: Detection Strategies. **EXCLI Journal**, v. 7, p. 44-62, 2008.

LANNA-FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINHO, R.S.C. Controle Biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, p. 12-20, 2010.

LEITE, E.M.A.; AMORIM, L.C.A. **Toxicologia Geral**. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas UFMG, 2001.

LEVINSON, B.L.; KASYAN, K.J.; CHIU, S.S.; CURRIER, T.C.; GONZÁLEZ, J.M. Identification of β -Exotoxin Production, Plasmids Encoding β -Exotoxin, and a New Exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by Using High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Bacteriology**, v.172, n. 6, p. 3172-3179, 1990.

LI, J.D.; CARROLL, L.; ELLAR, D.J. Crystal Structure of Insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å Resolution. **Nature**, v. 353, p. 815-821, 1991.

LU, T.; PAN, Y.; KAO, S.Y.; LI, C.; KOHANE, I.; CHAN, J.; YANKNER, B.A. Gene Regulation and DNA Damage in the Ageing Human Brain. **Nature**, v.429, p. 883-891, 2004.

MAGALHÃES, D.P.; FILHO, A.S.F. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Oecol. Bras.**, v. 12, p. 355-381, 2008.

MALLA, T.M.D.; SENTHILKUMAR, C.S.; AKHTAR S.; GANESH, N. Micronuclei as an Evidence of DNA Damage in Fresh Water Catfish *Heteropneustes fossilis* (BLOCH) Exposed to Synthetic Sindoor. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 6, p. 41-44, 2011.

MANTOVANI, A.; MARANGHI, F.; ROCCA, C.L.; TIBONI, G.M.; CLEMENTI, M. The role of toxicology to characterize biomarkers for agrochemicals with potential endocrine activities. **Reproductive Toxicology**, v. 26, p. 1-7, 2008.

MANYANGARIRWA, W.; TURNBULL, M.; MCCUTCHEON, G.S.; SMITH, J. P. Gene Pyramiding as a Bt Resistance Management Strategy: How Sustainable is This Strategy. **African J. of Biotechnol**, v. 5, p. 781-785, 2006.

MARTINEZ, C.; CABALLERO, P. Contents of *cry* Genes and Insecticidal Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Terrestrial and Aquatic Habitats. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 745-752, 2002.

MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F. WINKALER, E.U. Toxicidade e Efeitos da Amônia em Peixes Neotropicais. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. (Ed). **Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura**. Jaboticabal - SP: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, v. 1, p. 81-95, 2006.

MARTINS, E.S.; AGUIAR, R.W.S.; MARTINS, N.F.; BATISTA, A.C.; MELATTI, V.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Estudo da Atividade da Proteína Cry1Ia Expressa em Células de Inseto Promissora para o Controle do Bicudo do Algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) e da Lagarta do Cartucho-do-Milho (*Spodoptera frugiperda*). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento N° 92**, Embrapa, 2005.

MARTINS, C.D.C. Desenvolvimento de meios de cultivo alternativos para produção de *Bacillus sphaericus* tóxicos contra larvas de *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE). Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

MARTINS, E.S.; AGUIAR, R.W.d.S.; Martins, N.F.; MELATTI, V.M.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.M.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Recombinant Cry1Ia protein is Highly Toxic to Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1363-1371, 2008.

MARTINS, E.S. **Estudo da Atividade de Proteínas Cry, Derivadas de Bacillus thuringiensis Ativas para Insetos-Praga do Algodoeiro**. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília – UnB, 2009.

MARVIER, M.; McCREEDY, C.; REGETZ, J.; KAREIVA, P. A Meta-Analysis of Effects of Bt Cotton and Maize on Nontarget Invertebrates. **Science**, v. 316, p. 1475-1477, 2011.

MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Técnicas para Avaliação da Qualidade de Folículos Ovarianos pré-antrais Cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 433-442, 2007.

MATTHEWS, G.A. Pesticide Application Methods. **Harlow Essex: Longman Scientific & Technical**, p.405, 1992.

MENEZES, E.L.A. Controle Biológico: Na busca pela sustentabilidade da agricultura Brasileira. **Campos e Negócio**, 2006. Disponível em < http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/artigo_controle_biologico.html >. Acesso em 13/10/2010.

MERRITT, R.W.; WALKER, E.D.; WILZBACH, M.A.; CUMMIS, K.W.; MORGAN, W.T. A Broad Evaluation of *B.t.i* for Black Fly (Diptera: Simuliidae) Control in a Michigan River: Efficacy, Carry and Non-Target Effects on Invertebrates and Fish. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 5, p. 397-415, 1989.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. Medicina de Laboratório Veterinário Interpretação e Diagnóstico. Ed. Roca, 1995.

MEZZOMO, B. P. **Avaliação da Hematotoxicidade e da Genotoxicidade de Diferentes esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis* em Camundongos Swiss**. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretária de Vigilância em Saúde. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Disponível em < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_dengue_controle.pdf >. Acesso em 12/11/2011.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela Bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.3, p. 1603-2000, 2000.

MONNERAT, R.G.; PRAÇA, L.B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MONNERAT, R.;G. (Eds.) Fundamento para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 121- 155, 2006.

MONQUERO, P.A. Plantas Transgênicas Resistentes aos Herbicidas: Situação e Perspectivas. **Bragantia**, v. 64, n.4, p. 517- 531, 2005.

MOREIRA, L.L. Avaliação Ecotoxicológica Preliminar de Efluentes Contendo Brometo de etídio. Monografia – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

MORITA, T.; MACGREGOR, J.T.; HAYASHI, M. Micronucleus Assays in Rodent Tissues Other than Bone Marrow. **Mutagenesis**, v. 26, p. 223-230, 2011.

MUGHAL, A.; VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G.B. Micronucleus and Comet Assay in the Peripheral Blood of Juvenile Rat: Establishment of Assay Feasibility, Time of Sampling and the Induction of DNA Damage. **Mutation Research**, p. 86-94, 2010.

NIH. National Institute of Environmental Health Sciences. National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors – Peer Review, 2001.

NOVATO-SILVA, E.; SILVA, J.M.; SOUZA, R.A.; RODRIGUES, F.A.L.; SILVA, G.M.E. Educação para a Saúde: O Conhecimento Como Ferramenta de Redução dos Riscos para Exposição Ocupacional a Agrotóxicos. **Anais do 7º Encontro de Extensão da Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte**, 2004.

OECD - Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* - Derived Insect Control Proteins. Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. ENV/JM/MONO:14, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. Segurança de Agentes Microbiológicos para o Controle de Pragas: Avaliação Toxicológica, Regulamentação e Situação Atual. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.18, n. 1, p. 71-75, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; CASTRO, M.L.M.P. Porque Regular Produtos Biológicos? In: OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MONNERAT, R.;G. (Eds.) Fundamento para a Regulamentação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 27- 30, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. **J. Braz. Ecotoxicology**, v.3, p. 1-7, 2008.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MUNIZ, D.H.F.; FREIRE, I.S.; RAMOS, F.R.; ALVES, R.T.; JONSSON, C.M.; GRISOLIA, C.K.; MONNERAT, R.G. Susceptibility of Non-Target Invertebrates to Brazilian Microbial Pest Control Agents. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 1354-1360, 2011.

PAPA, J.C.M.; PURICELLI, E.C.; FELIZIA, J.C. Malezas Tolerantes a Herbicidas em Soja. In: **IDIA XXI**, p. 64-67, 2002.

PAULA-MORAES, S.V.; OLIVEIRA, C.M. Princípios de Controle: Estratégias e Táticas Empregadas no Manejo Integrado de Pragas – MIP. In: OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MONNERAT, R.;G. (Eds.) Fundamento para a Regulamentação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 31- 48, 2006.

PAUK, J.; STEFANOV, I.; FEKETE, S.; BÖGRE, L.; KARSAI, I.; FEHÉR, A.; DUDITS, D. A Study of Different (CaMV 35S and *mas*) Promoter Activities and Risk Assessment of Field use in Transgenic Rapeseed Plants. **Euphytica**, v. 85, n.1-3, p. 411-416, 1995.

PEREIRA, E.V.P.; KROLL, B.L.; SOUZA, E.B. Análise da Frequência de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados em Camundongos (*Mus domesticus domesticus*), Tratados com Enzicoba (COBAMIDA). **Arq. Ciência Saúde Unipar, Umuarama**, v. 8, p. 31-31, 2004.

PIGOTT, C.R.; ELLAR, D.J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 254-281, 2007.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A C. M. M.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* Efetivas contra Insetos das Ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

PRETTI, E.; CAVALCANTE, D.; SIMONATO, J.D.; MARTINEZ, C.B.R. Ensaio do Cometa e Indução de Anormalidades Eritrocíticas Nucleares para Detecção de Genotoxicidade e Mutagenicidade no Peixe Neotropical *Prochilodus lineatus* Expostos à Fração Solúvel da Gasolina. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu – MG, 2007.

REIS, J.A.T.; MENDONÇA, A.S.F. Análise Técnica dos Novos Padrões Brasileiros para Amônia em Efluentes e Corpos d'água. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 14, p. 353-362, 2009.

REN, Z.; MA, E.; GUO, Y. Chromosome Aberration Assays for the Study of Cyclophosphamide and *Bacillus thuringiensis* in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae). **Mutation Research**, v. 520, p. 141–150, 2002.

RIBEIRO, L. R. Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.) Mutagênese Ambiental. Canos, RS: Ed. ULBRA. p. 173-200, 2003.

RIVEIRO, C.L.G. **Perfil da Frequência de Micronúcleos e de Danos no DNA de Diferentes Espécies de Peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil**. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2007.

ROTTA, M.A. Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura. **Documentos 53**, Embrapa Pantanal, Corumbá-MS, 2003.

SANTOS, T.S.; ABREU, F.R.S. O Cultivo de Organismos Geneticamente Modificados e a Contaminação da Água, **Cadernos UniFOA**. Ed. 12, 2011.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do Micronúcleo em Células Humanas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.) Mutagênese Ambiental. Canos, RS: Ed. ULBRA. p. 201-223, 2003.

SCHMID, W. The Micronucleus Teste. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 774-806, 1998.

SCHWARZENBACH, R.P.; ESCHER, B.I.; FENNER, K.; HOFSTERTTER, T.B.; JOHNSON, C.A.; GUNTEN, U.V.; WEHRLI, B. The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. **Science**, v.313, pag. 1072-1077, 2011.

SHIN, B.S.; PARK, S.H.; CHOI, S.K.; KOO, B.T.; LEE, S.T.; KIM, J.I. Distribution of *cryV*-Type Insecticidal Protein Genes in *Bacillus thuringiensis* and Cloning of *cryV*-Type Genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2402-2407, 1995.

SILVA, M.T.B. Fatores que Afetam a Eficiência Sobre *Spodoptera frugiperda* Smith em Milho. **Ciência Rural**, v. 29, p. 383-387, 1999.

SILVA, S. F.; DIAS, D.G.S.; MARTINS, E.S.; SOARES, C.M.S.; DIAS, J.M.C.S.; MONNERAT, R.S. Prospecção de Estirpes de *Bacillus sphaericus* Tóxicas Contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Pesquisa Brasileira de Agropecuária**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n 31, 2002.

SILVA, A.C.; NEPOMUCENO, J.C. Avaliação da Frequência de Micronúcleos em Eritrócitos Periféricos de mandi-amarelo. **Perquirer**, v. 1, p. 167-179, 2010.

SILVA, A.L.L.; WALTER, J.M.; HORBACH, M.A.; QUOIRIN, M. Contenção do Fluxo Gênico de Plantas Geneticamente Modificadas. **Caderno de Pesquisa, série Biologia**, v. 19, p. 18-26, 2007.

SILVA, M.D. Biomonitoramento de Uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Através da Aplicação de Biomarcadores Bioquímicos, Morfológicos e Genéticos em *Astyanax* sp. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação Planta-Inseto: Adaptação dos Insetos aos Inibidores de Proteinase Produzidos pelas Plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.2, p.38-42, 2000.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 175, p.184 –191, 1988.

SOARES, R. M.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO S. M. F. O. Accumulation and Depuration of Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) Under Laboratory Conditions. **Aquatic toxicology**, v. 70, p. 1-10, 2004.

SOARES, C.M.; VALADARES, G.F.; AZEREDO, R.M.C.; KUAYE, A.Y. Contaminação Ambiental e Perfil Toxigênico de *Bacillus cereus* Isolados em Serviços de Alimentação. **Ciência Rural**, v. 38, n.2, 2008.

SPADOTTO, C. A. Abordagem Interdisciplinar na Avaliação Ambiental de Agrotóxicos. Petrópolis: Vozes, p. 56 – 59, 2006.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay. A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: HENDERSON, D.S. (Ed.). *Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols: Mammalian Systems*. Humana Press, Totowa, NJ. P. p. 275-286, 2005.

SPEIT, G.; SCHÜTZ, P. The Effect of Inhibited Replication on DNA Migration in the Comet Assay in Relation to Cytotoxicity and Clastogenicity. **Mutation Research**, v. 655, p. 22-27, 2008.

SUJII, E.R.; PIRES, C.S.S.; SCHMIDT, F.G.V.; ARMANDO, M.S.; BORGES, M.M.; CARNEIRO, R.G.; VALLE, J.C.V. Controle Biológico de Inseto-Praga na Soja Orgânica do Distrito Federal. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.19, p.299-312, 2002.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and Characterization of a Novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 1211-1217, 1992.

THOMPSON, C.B.; JAKUBOWSKI, J.A.; QUINN, P.G.; DEYKIN, D.; VALERI, C.R. Platelet Size as a Determinant of Platelet Function. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 101, p. 205-213, 1983.

THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M.; WILD, M.; WALFIELD, A.M.; POLLOCK, T.J. Structural Similarity Between the Lepidoptera and Diptera-Specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "*kurstaki*" and "*israelensis*". **Bacteriol.**, v. 166, p. 801-811, 1986.

TRAGHETTA, D.G.; VAZ, C.M.P.; MACHADO, S.A.S.; CRESTANA, S. VIEIRA, E.M.; MARTIN-NETO, L. Mecanismos de Sorção da Atrazina em Solos: Estudos Espectroscópicos e Polarográficos, **Comunicado Técnico Embrapa**, nº 14, p.1-7, 1996.

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; MELLAERT, H.V. Receptors on the Brush Border Membrane of the Insect Midgut as Determinants of the Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1378-1385, 1990.

VARELLA, D. Combate à Dengue. Disponível em: < <http://drauziovarella.com.br/doencas-e-sintomas/combate-a-dengue/>>. Acesso em 12/11/2011.

VILCHES, M. **Análise Genotóxica do Rio Cadeia/RS Através do Ensaio do Cometa e Teste de Micronúcleo e Anormalidades Nucleares Utilizando Peixes como Bioindicadores**. Dissertação de Mestrado – Centro Universitário Feevale, Nova Hamburgo, 2009.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Test Guidelines OPPTS 885.4200 Freshwater Fish Testing Tier I**. USEPA 712 –C-96-332, february 1996.

VASQUEZ, M.Z. Combining the *in vivo* Comet and Micronucleus Assays: a Practical Approach to Genotoxicity Testing and Data Interpretation. **Mutagenesis**, v. 25, p. 187-199, 2010.

VASSAL, J.M.; BARJAC, H.De.; FRUTOS, R.; FEDERICI, B.A. Isolation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* from Diseased Field-Collected Larvae of the Saturniid Moth, *Hylesia metabus*, in French Guiana. **FEMS Microbiology Letters**, v. 107, p. 199-203, 1993.

WELSHONS, W.V.; THAYER, K.A.; JUDY, B.M.; TAYLOR, J.A.; CURRAN, E.M.; SAAL, F.S.V. Large Effects from Small Exposures. I. Mechanisms for Endocrine Disrupting Chemicals with Estrogenic Activity. **Environmenta Health Perspectives**, v. 111, p. 994-1006, 2003.

WHITELEY, H.R.; SCHNEPF, H.E. The Molecular Biology of Parasporal Crystal Body Formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v.40, p. 549-576, 1986.

WHO, WORLD HEALTH ORGANISATION. Fourteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control, Safe Use of Pesticides, Technical Report Series No. 813, WHO, Geneva, 1992.

YEO, S.R.; BINKOWSKI, F.P.; MORRIS, J.E. **Aquaculture Effluents and Waste By-Products: Characteristics, Potential Recovery, and Beneficial Reuse**. NCRAC Publications Office, 2004.

YOUSTEN, A.A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological Factors Relateds to Its Potencial as a Mosquito Larvicide. **Adv. In Biothechnol. Proc.**, v. 3, p. 315-343, 1984.

YU, C.; MULLINS, M.A.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. The *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Lyses Midgut Epithelium Cells of Susceptible Insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p.532-536, 1997.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; ROSE-YOUNG, L.; BULLA, L.A. Jr. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Depend on Specific Binding of the Toxin to the Cadherin Receptor BT-R1 Expressed in Insect Cells. **Cell Death Differ**, v. 12, p. 1407-1416, 2005.

ZHANG, L.; TANG, X.; ROTHMAN, N.; VERMEULEN, R.; JI, Z.; SHEN, M.; QIU, C.; GUO, W.; LIU, S.; REISS, B.; FREEMAN, L.B.; GE, Y.; HUBBARD, A.E.; HUA, M.; BLAIR, A.; GALVAN, N.; RUAN, X.; ALTER, B.P.; XIN, K.X.; LI, S.; MOORE, L.E.; KIM, S.; XIE, Y.; HAYES, R.B.; AZUMA, M.; HAUPTMANN, M.; XIONG, J.; STEWART, P.; LI, L.; RAPPAPORT, S.M.; HUANG, H.; FRAUMENI, J.F.; SMITH, M.T.; LAN, Q. Occupational Exposure to Fomaldehyde, Hematotoxicity, and Leukemia-Specific Chromosome Changs in Cultured Myeloid Progenitor Cells. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v, 19, p. 80-88, 2010.

ZHOU, G.; YAN, J.; DASHENG, Z.; ZHOU, X.; YUAN, Z. The Residual Occurrences of *Bacillus thuringiensis* biopesticides in food and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 68-72, 2008.