



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Pós-graduação em Patologia Molecular

Bélin Poletto Mezzomo

**Avaliação da hematotoxicidade e da genotoxicidade de diferentes esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis* em camundongos Swiss**

Brasília  
2010

Bélin Poletto Mezzomo

**Avaliação da hematotoxicidade e da genotoxicidade de diferentes esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis* em camundongos Swiss**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Patologia Molecular na área de concentração em Genética.

Orientador: Dr. Cesar Koppe Grisolia

Co-orientadora: Dra. Ana Luisa Miranda-Vilela

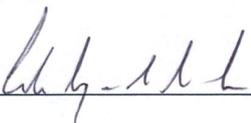
Brasília  
2010

Bélin Poletto Mezzomo

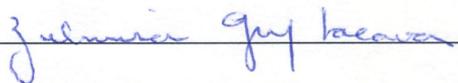
**Avaliação da hematotoxicidade e da genotoxicidade de diferentes esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis* em camundongos Swiss**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Patologia Molecular na área de concentração em Genética.

Aprovada em: 29 de outubro de 2010.



Dr. Eduardo Cyrino Oliveira-Filho  
EMBRAPA - CPAC



Dr. Zulmira Guerrero Marques Lacava  
Departamento de Genética e Morfologia  
Universidade de Brasília



Dr. Cesar Koppe Grisolia  
Departamento de Genética e Morfologia  
Universidade de Brasília  
Orientador

Brasília  
2010

## DEDICATÓRIA

*Honrosamente dedico esta vitória aos meus pais, meus ídolos.*

*E “in memória”: a **Dom Franco Dalla Valle** pelos seus sábios ensinamentos e eternas lições de vida. Por ter acreditado nos jovens e proporcionado aos filhos de Juina um futuro mais promissor.*

*Sou fruto dos seus esforços!*

## AGRADECIMENTOS

A Fundação Universidade de Brasília e a Faculdade de Medicina pela oportunidade de ingressar-me no Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular. À coordenação e aos secretários Gledson Alessandro R. Silva, Jaqueline A. de Oliveira e Daniele G. Miranda obrigada pela atenção e esclarecimentos prestados durante a minha fase acadêmica.

Ao CNPq pelo respaldo financeiro e à EMBRAPA – CENARGEN, em especial à Doutora Rose Gomes Monnerat, pela disponibilidade das toxinas que foram fundamentais para a efetivação deste trabalho, e ao Vinícius Fiuza Dumas pelo processamento do material.

Aos membros da Banca Examinadora, professor Eduardo Cyrino de Oliveira-Filho, professora Zulmira Lacava e professora Aline Pic-Taylor, os meus sinceros agradecimentos por terem aceitado o convite de participar e contribuir com esta Dissertação. Obrigada também pela compreensão.

À médica hematologista e chefe do Núcleo de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) – Margarete Barbosa Daldegan – pela análises das lâminas de hematologia e grande ajuda na interpretação dos dados. À médica hematologista Franciele Moraes Amaral e à biomédica Graciana Souza Lordelo, técnica em hematologia do HBDF, pela ajuda na interpretação dos dados do capítulo 1.

Ao Luiz Beltrão Gomes de Souza pelas correções e dicas imprescindíveis na contextualização da revisão de literatura.

Ao meu orientador Cesar Koppe Grisolia pela acolhida no ensejo de fazer parte da sua equipe de trabalho. Obrigada pela credibilidade e confiança. Acima de tudo, agradeço-te pela amizade e pelo “paizão” que sempre fostes comigo e com tuas orientadas (os). Tenho-te como um grande orientador e um nobre AMIGO.

A minha co-orientadora, “mãezona”, amiga e conselheira **Ana Luisa Miranda Vilela**. OBRIGADA por aceitar e participar tão intensamente do meu trabalho. Obrigada pelo valioso auxílio na elaboração estatística e interpretação dos meus resultados; pelas correções e orientações; pelas horas de sono cedidas e pela paciência nos meus momentos de dificuldades. Obrigada por não desistir de mim.

À professora Zulmira pela amabilidade e pela colaboração com a minha pesquisa, cedendo gentilmente o hematocitômetro.

A Flavia Portilho – Flavinha, tia Flávia – que foi essencial aos meus experimentos e quem literalmente “deu o sangue para este trabalho”. Não me esquecerei dos momentos inusitados em que tive a oportunidade de conviver ao seu lado. Você é uma grande amiga.

Aos técnicos, que foram mais que técnicos, Adriana (Dri), Danubia, Eliza (Glorinha) e Ornil, muito obrigada por terem estado presentes e facilitado muitas das minhas atividades.

À Ieler e Vanessa pela dedicação e pelos esforços imensuráveis na parte prática da minha pesquisa. Pessoas fundamentais. OBRIGADA! Cesar, Ana, Flávia, Dri, Danubia, Eliza, Ieler, Vanessa e Ornil, digo a vocês: formamos uma grande equipe e a minha conquista hoje é uma mérito **NOSSO!**

Aos demais colegas e amigos do laboratório de Genética, principalmente: Alba, Ana Elizabeth, Arthur, Cássia, Dani, Dudu, Grá, Penha, Ingrid, Júlia, Letícia, Lívia, Lane, Luciana, Gustavo, Eduardo, Eduardo (Departamento), prof. Edgar, Marcella, Madaí, Mila, Mariana, Mary-Ann, Lilian, Rafaela e professora Nazaré. Desfrutei de excelentes momentos ao lado de vocês que ficarão na memória – saudades das nossas confraternizações!

Ao CAEP da UnB, em nome das psicólogas Elaine, Regina Miranda e Aline por todo respaldo psicológico que contribuiu para eu vencer alguns dos meus obstáculos, permitindo a concretização deste trabalho.

Ao meu namorado e fiel amigo Raphael C. A. Peixoto, obrigada pelo incentivo diário que me motivou a lutar e a não desistir deste sonho. Obrigada pelo carinho, paciência e por participar junto comigo não só dos momentos alegres, sobretudo, dos momentos mais conturbados. OBRIGADA por também ajudar a me conhecer a cada dia. VOCÊ É MUITO ESPECIAL. Às famílias Cândido e Apolinário Peixoto e à Geny pela acolhida, pelo apoio e por me deixarem fazer parte do dia-a-dia de cada um de vocês.

A Denys Aragão pelo amparo na minha chegada em Brasília e por ter sido sempre tão prestativo e um grande Amigo.

À Vera Eunice, Edinho, Luciane, Liliam, Andréia, Iraci, Ana Paula, Rita, Ramayana, Indira, Taty, Carol, Ludmilla e Talita, pessoas que formaram minha nova família brasileira. Vocês são meus irmãos de coração. Dona Vera, meus agradecimentos pela solidariedade, pelo carinho e pelos bolinhos de polvilho de nossas manhãs e tardes. OBRIGADA por ter cumprido, mesmo que involuntariamente, o papel de uma mãe para mim.

As minhas eternas amigas Ana Silvia, Danielly, Débora, Isabela, Juliana e Paula por estarem tão presentes em minha vida, mesmo estando tão distantes.

Aos meus familiares que torceram por mim, especialmente, a tia Nena, tia Salete, tia Nilza, tia Ro e primas Tânia, Angela, Carla e Gerli: obrigada pelas orações e novenas que me fortaleceram na fé. A minha prima Rosângela e à tia Loiri pelo carinho e pelos cuidados. A minha prima e afilhada Vanessa pelas ligações de solidariedade e ao meu primo Maycon pela grandiosa ajuda com a tecnologia digital. À tia Laide e aos meus tios Zeca, Poletto e Ivo, e ao meu primo Dilson pela confiança. Obrigada por TUDO.

Ao meu amado irmão Lucas que do seu modo particular sempre esteve comigo: Obrigada!

Principalmente, aos Meus Pais, pessoas eleitas por Deus para serem Os Doutores da minha vida - Mãe, OBRIGADA por ter sido a primeira a acreditar e a incentivar-me a estar aqui hoje. Pai, OBRIGADA pelas preciosas recomendações e pela força nos meus momentos de saudades. A vocês, **Elizabete Marta** e **Leo**, o âmago dos meus sinceros agradecimentos pelo apoio afetivo, moral, financeiro e pelas renúncias diárias que proporcionaram esta vitória.

**A Nossa Senhora Aparecida por me ter em seu colo e amparar-me nas sombras das dificuldades... Sobretudo, ao meu maior alicerce: a DEUS! Obrigada Senhor pela minha vida e por me encaminhar a mais uma vitória, conduzindo-me sempre para o melhor caminho!**

*“Viva!!! Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, por que o mundo pertence a quem se atreve e a vida é MUITO para ser insignificante.”*

Charles Chaplin

## RESUMO

As proteínas inseticidas (ICPs) do *Bacillus thuringiensis* (Bt) são  $\delta$ -endotoxinas produzidas sob a forma das inclusões cristalinas geométricas durante a esporulação e designadas como proteínas cristais (Cry). As toxinas Bt conferem a este entomopatógeno propriedades inseticidas, sendo usadas em várias formulações de bioinseticidas rotineiramente empregadas no controle biológico de pragas agrícolas. Inseticidas Bt têm a vantagem de serem muito mais específicos do que os inseticidas químicos sintéticos de amplo espectro, e, portanto, são considerados como agentes de controle de insetos favoráveis ao meio ambiente. Entretanto, com a introdução no ambiente das plantas geneticamente modificadas que expressam as  $\delta$ -endotoxinas (plantas transgênicas de colheitas), a disponibilidade biológica das proteínas Cry aumentou, e por questões de biossegurança seus efeitos devem ser rigorosamente investigados, sobretudo, para organismos não-alvo. As avaliações de plantas-Bt devem considerar tanto o seu potencial para produzir efeitos perigosos quanto a exposição de organismos sensíveis e não-alvo resultante da disseminação e persistência da toxina. Assim, objetivou-se avaliar, em camundongos albinos Swiss, a hematotoxicidade e genotoxicidade de quatro variedades de Bt esporos-cristais – cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, administrados em uma única dose oral (por gavagem) ou intraperitoneal de 27 mg/Kg (dose mínima), 136 mg/Kg (dose intermediária) ou 270 (dose máxima) mg/Kg, 24 h antes da eutanásia. Para a via oral, os efeitos de cada um dos esporos-cristais também foram testados após uma única administração de 72 h ou 7 dias antes da eutanásia; combinações binárias de Cry foram avaliadas na dose máxima, com uma única administração 24 h antes da eutanásia. Camundongos controle receberam água filtrada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP - controle positivo) a 27 mg/Kg. Para as avaliações de hematotoxicidade, amostras de sangue coletadas por punção cardíaca foram processadas em um analisador hematológico automatizado; para as análises de genotoxicidade, o teste do micronúcleo foi realizado em células da medula óssea dos camundongos. Os efeitos hematotóxicos e/ou genotóxicos variaram com a dose, o esporo-cristal estudado e a via de administração. Cry1Ac 136 mg/kg administrada intraperitonealmente foi a mais tóxica, provocando 100% de mortalidade nos camundongos, enquanto alterações hematológicas e da medula óssea ocorreram em função dos demais tratamentos em ambas as vias. Na via oral, as administrações com Cry provocaram hematotoxicidade seletiva para os 3 tempos de exposição, sendo particularmente tóxicas para a linhagem eritróide; leucocitose também foi observada, bem como redução significativa da proliferação de células da medula óssea, demonstrando efeitos citotóxicos, mas não genotóxicos. Tais efeitos persistiram nos outros tempos de exposição, tornando-se mais evidentes no tempo de 7 dias. Os mesmos tipos de resultados foram observados para as combinações binárias no tempo de exposição de 24 h. Assim, os resultados indicam que (1) as toxinas Cry não foram destruídas no estômago; (2) possivelmente, foram ativadas no intestino, e (3) persistiram no corpo dos animais. Também sugerem a possibilidade da existência de moléculas Cry-receptoras desconhecidas no intestino de vertebrados, ou pelo menos de receptores com alguma afinidade pelas toxinas Cry. A via intraperitoneal foi mais tóxica do que via oral, apresentando alterações leucocitárias mais graves, bem como citotoxicidade para a medula óssea e genotoxicidade. Assim, os resultados demonstraram que as toxinas Cry não são inócuas para vertebrados e que a disseminação e a persistência das toxinas Bt no ambiente em função do aumento das culturas transgênicas pode ter efeitos ecológicos e para a saúde perigosos. Além disso, levando-se em consideração a exposição contínua de humanos e animais (particularmente os domésticos) em níveis consideráveis de Bt através da dieta, os resultados sugerem que são necessários protocolos mais eficientes de avaliação, com exposição mais longa dos mamíferos a estas dietas, e

envolvendo observações clínicas antes de concluir que os transgênicos Bt são seguros para a alimentação.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis* (Bt),  $\delta$ -endotoxinas, Cry, biossegurança, organismos não-alvo, bioinseticida.

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal crystal proteins (ICPs) are  $\delta$ -endotoxins designated protein crystals (Cry); they are produced as geometric crystalline inclusions during sporulation. Bt toxins confer insecticidal properties on this entomopathogen, and are used in some bioinsecticide formulations routinely employed in the biological control of agricultural pests. Bt insecticides have the advantage of being much more specific than broad-spectrum synthetic chemical insecticides, and they are therefore considered environmentally friendly insect control agents. However, with the introduction into the environment of genetically modified plants expressing  $\delta$ -endotoxins (transgenic crops), bioavailability of Cry proteins has increased, and for biosecurity reasons their effects must be rigorously researched, mainly for non-target organisms. The assessment of Bt plants must consider both their potential to produce hazardous effects and exposure of susceptible and non-target organisms resulting from the dissemination and persistence of the toxin. Thus, we aimed to evaluate, in Swiss albino mice, the hematotoxicity and genotoxicity of four varieties of Bt spore-crystals. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2Aa were administered with a single oral (by gavage) or intraperitoneal dose of 27 mg/Kg (minimum dose), 136 mg/Kg (intermediate dose) or 270 (maximum dose) mg/Kg, 24 h before euthanasia. For the oral route, the effects of individual Cry spore-crystals were also tested after a single administration 72 h or 7 days before euthanasia, and Cry binary combinations were also assayed at the maximum dose with a single administration 24 h before euthanasia. Control mice received filtered water (negative control) or cyclophosphamide (CP – positive control) at 27 mg/kg. For hematotoxicity evaluations, blood samples collected by cardiac puncture were processed in a multiple automated hematology analyzer; for genotoxicity analyses, micronucleus test with mice bone marrow cells was carried out. The hematotoxic and/or genotoxic effects varied with the dose, the studied spore-crystal and the route of administration. Cry1Ac 136 mg/Kg intraperitoneally administered was the most toxic, provoking 100% mortality in mice, while hematological and bone marrow alterations occurred as a function of the other treatments by both routes. By the oral route, Cry administrations provoked selective hematotoxicity for the 3 exposure times, being particularly toxic to the erythroid lineage; leucocytosis was also observed. A significant reduction in bone marrow cell proliferation was also noted, demonstrating cytotoxic but not genotoxic effects. These effects persisted for the other exposure times, becoming more evident at the exposure time of 7 days. Similar results were observed for the binary combinations at the exposure time of 24 h. Thus, results indicate that (1) Cry toxins were not destroyed in the stomach; (2) they were possibly activated in the gut; and (3) they persisted in the body of the animals. Outcomes also suggest the possibility that unknown Cry-receptor molecules exist in the intestine of vertebrates or at least receptors with some affinity for Cry toxins. The intraperitoneal route was more toxic than the oral route, presenting more severe leucocitary alterations, as well as cytotoxicity for bone marrow and genotoxicity. Hence, results demonstrate that Cry toxins are not innocuous for vertebrates and that environmental dissemination and persistence of Bt toxins resulting from the increase in transgenic crops can affect ecology and health. Moreover, taking into account the continued exposure of humans and animals (particularly domestic) at considerable levels of Bt through diet, results suggest that more efficient protocols of Bt evaluation are needed, using a new assessment and longer exposure of mammals to these diets, with cautious clinical observations, before concluding that transgenic Bt plants are safe to eat.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis* (Bt),  $\delta$ -endotoxins, Cry, biosecurity, non-target organisms, bioinsecticide.

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1:** Micrografia eletrônica de transmissão do *B. thuringiensis* (Bt) (2 µm) em fase de esporulação. SP- esporo; PB (corpo proteico; δ-endotoxina) (Adaptado de De Maagd *et al.*, 2001)..... **24**
- Fig. 2:** Estrutura ativa das proteínas Cry (Domínios I, II, III) apresentando seqüências de blocos altamente conservados (retângulos coloridos), destaque para Cry1 e Cry2 (Adaptado de De Maagd *et al.*, 2001)..... **31**
- Fig. 3:** Estruturas das toxinas Cry1Aa e Cry2Aa, por cristalografia e difração de raios-X. O domínio I, em vermelho; o domínio II, em azul; o domínio III, em verde; e, em amarelo, o domínio N-terminal da pró-toxina Cry2Aa (adaptado de PIGGOT & ELLAR, 2007)..... **31**
- Fig. 4:** Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S997. cb: cristal bipiramidal; cc: cristal cubóide; ce: cristal esférico; ep: esporo (aumento de 10.000 x) (adaptado de PRAÇA *et al.*, 2004)..... **32**
- Fig. 5:** Representação esquemática do processamento proteolítico de algumas proteínas Cry. As caixas brancas representam as protoxinas, enquanto as regiões listradas representam as toxinas ativas. As setas sólidas demonstram os sítios de clivagem nas porções N-terminal e C-terminal das toxinas ativas. As setas listradas mostram clivagens intra-moleculares das proteínas ativas (BRAVO *et al.*, 2007)..... **33**
- Fig. 6:** Quatro moléculas receptoras das proteínas Cry1A. CADR – receptor tipo caderina; APN – Aminopeptidase N; ALP – Fosfatase Alcalina; GCR – receptor glicoconjugado (Adaptado de BRAVO *et al.*, 2007)..... **34**
- Fig. 7:** Mecanismo de ação das toxinas Cry. (1) Solubilização e ativação da proteína. (2) Ligação da toxina monomérica com o primeiro receptor (CADR), mudança conformacional da toxina e clivagem da α-hélice 1. (3) Ligação da toxina ao segundo receptor (GPI-APN ou GPI-ALP) e mudança conformacional da proteína. (5) Inserção da estrutura oligomérica na membrana e formação do poro (adaptado de BRAVO *et al.*, 2007)..... **35**
- Fig. 8:** Esquema do novo modelo proposto para o mecanismo de ação das proteínas Cry – transdução de sinal. A toxina Cry interage com a região de ligação (TBR) do receptor (BT-R), estimulando a proteína G e a adenilato ciclase (AC), promovendo cAMP intracelular. A proteína quinase (PKA) é acionada, desestabilizando o citoesqueleto e canais iônicos, provocando assim, a morte celular (adaptado de ZHANG *et al.*, 2006)..... **36**

## LISTA DE QUADRO

**Quadro 1** – Subespécies do *Bacillus thuringiensis* armazenadas no Banco de Germoplasma da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEM), com as suas respectivas estirpes e proteínas sintetizadas por elas. \*Em destaque, a subespécie *kurstaki* e as Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, empregadas neste estudo..... **29**

## LISTA DE TABELAS

### 5 CAPÍTULO I – Avaliação da hematotoxicidade e da genotoxicidade de esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis kurstaki* administrados por via oral e via intraperitoneal em camundongos Swiss

**Tabela 1** – Resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Ac na concentração de 27 mg/Kg e Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente (*per os*, p.o.) ou com uma única aplicação intraperitoneal (i.p.) 24h antes da eutanásia. Camundongos controle receberam água filtrada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg. ....58

**Tabela 2** – Resultados do leucograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Ac na concentração de 27 mg/Kg e Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente (*per os*, p.o.) ou com uma única aplicação intraperitoneal (i.p.) 24h antes da eutanásia. Camundongos controle receberam água filtrada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg. .... 60

**Tabela 3** – Resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos tratados esporos-cristais de Bt Cry1Ac na concentração de 27 mg/Kg e Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente (*per os*, p.o.) ou com uma única aplicação intraperitoneal (i.p.) 24h antes da eutanásia. Camundongos controle receberam água filtrada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg. .... 61

**Tabela 4** – Resultados do teste do micronúcleo na medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Ac na concentração de 27 mg/Kg e Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente (*per os*, p.o.) ou com uma única aplicação intraperitoneal (i.p.) 24h antes da eutanásia. Camundongos controle receberam água filtrada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg. .... 63

### 6 CAPÍTULO II - Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis kurstaki* administrados por via oral em doses simples e combinadas

**Tabela 1** – Resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa na concentração de 27 e 136 mg/Kg administrados oralmente (*per os*, p.o.) com uma única administração no tempo 24 h antes do sacrifício, e na concentração de 270 mg/Kg em exposição de 24 h, 72 h ou 7 dias antes do sacrifício. Camundongos controle receberam água destilada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg. ....91

**Tabela 2** – Resultados do leucograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa na concentração de 27 e 136 mg/Kg administrados oralmente (*per os*, p.o.) com uma única administração no tempo 24 h antes do sacrifício, e na concentração de 270 mg/Kg em exposição de 24 h, 72 h ou 7 dias antes do sacrifício. Camundongos controle receberam água destilada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg. ....**93**

**Tabela 3** - Resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa na concentração de 27 e 136 mg/Kg administrados oralmente (*per os*, p.o.) com uma única administração no tempo 24 h antes do sacrifício, e na concentração de 270 mg/Kg em exposição de 24 h, 72 h ou 7 dias antes do sacrifício. Camundongos controle receberam água destilada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg. .... **95**

**Tabela 4** - Resultados do teste do micronúcleo camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa na concentração de 27 e 136 mg/Kg administrados oralmente (*per os*, p.o.) com uma única administração no tempo 24 h antes do sacrifício, e na concentração de 270 mg/Kg em exposição de 24 h, 72 h ou 7 dias antes do sacrifício. Camundongos controle receberam água destilada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg. .... **97**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	adenilato ciclase ATP – adenosina trifosfato
ADN	ácido desoxirribonucléico
ALP	Fosfatase Alcalina
APN	Aminopeptidase N
Art.	Artigo
ATP	adenosine trifosfato
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>
C	controle negativo
CADR	receptor tipo caderina
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CENARGEN	Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
CP	controle positivo
Cry	proteínas cristal
<i>cry</i>	genes codificadores de proteínas cristal
Cyt	proteínas citotóxicas
dL	decilitros
EDTA	ácido etilediaminotetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPC	Eritrócitos policromáticos
Fig.	Figura
fl	fentolitros
g	grama
GCR	receptor glicoconjugado
GM	geneticamente modificado
h	hora
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT	Hematócrito
HGM	Hemoglobina

ICPs	proteínas cristais inseticidas (do inglês “Insecticidal Crystal Proteins”)
INC	Normativa Conjunta
i.p.	intraperitoneal
kDa	quilo Dalton
Kg	quilograma
kDa	quilodalton
MDa	megadalton
mg	miligrama
μL	microlitro
mL	mililitro
MN	micronúcleos
MN-ENC	micronúcleos em Eritrócitos normocromáticos
MN-EPC	micronúcleos em Eritrócitos policromáticos
OGM	organismos geneticamente modificados
pH	potencial de hidrogênio
pg	picograma
P-LCR	porcentagem de plaquetas gigantes (do inglês <i>Platelet large cell ratio</i> )
PDW	amplitude da distribuição do tamanho de Plaquetas (do inglês <i>Platelet Distribution Width</i> )
PKA	proteína quinase
p.o.	via oral (do inglês <i>per os</i> )
RDW	amplitude da distribuição do tamanho do eritrócito (do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i> )
RNA	ácido ribonucléico
SFB	Soro fetal bovino
TPF	toxinas formadoras de poros
UTP	uridino trifosfato
Vip	proteínas do <i>Bacillus thuringiensis</i> sintetizadas no estágio vegetativo.
<i>vip</i>	genes codificadores das proteínas Vip
VCM	volume corpuscular médio
VPM	volume plaquetário médio
x g	velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\delta$	delta
$\gamma$	gama
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
%	porcentagem

## SUMÁRIO

<b>CONSIDERAÇÕES AO LEITOR</b> .....	21
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	22
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
<b>2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER</b> .....	24
2.1.1 Características .....	24
2.1.2 Contextualização Histórica .....	25
<b>2.2 TOXINAS PRODUZIDAS pelo <i>B. thuringiensis</i></b> .....	26
2.2.1 $\delta$ -endotoxinas – Cry e Cyt.....	26
2.2.2 $\alpha$ -Exotoxinas .....	26
2.2.3 $\beta$ -Exotoxina .....	27
2.2.4 Exoenzimas .....	27
2.2.5 Proteínas Vegetativas Inseticidas - Vips .....	27
<b>2.3 PROTEÍNAS Cry</b> .....	28
2.3.1 Classificação das estirpes.....	29
2.3.2 Estrutura tridimensional das Cry .....	30
2.3.2.1 Morfologia dos Cristais.....	32
2.3.3 Mecanismo de ação.....	32
<b>2.4 CULTIVARES Bt-TRANSGÊNICOS E BIOSSEGURANÇA</b> .....	36
<b>2.5 RESISTÊNCIA DE INSETOS AO <i>Bacillus thuringiensis</i></b> .....	36
<b>2.6 REGULAMENTAÇÃO PARA REGISTRO DE AGENTES MICROBIOLÓGICOS EM TERRITÓRIO NACIONAL</b> .....	38
<b>2.7 PROTOCOLOS INTERNACIONAIS DE BIOSSEGURANÇA</b> .....	40
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	42
<b>4 OBJETIVOS GERAIS</b> .....	42
<b>5 CAPÍTULO I – Avaliação da hematotoxicidade e da genotoxicidade de esporos-cristais do <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> administrados por via oral e via intraperitoneal em camundongos Swiss</b> .....	43
<b>5.1 INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	44
<b>5.3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	45
5.3.1 Obtenção das toxinas esporo-cristal .....	45
5.3.2 Camundongos.....	45
5.3.3 Vias de administração.....	45
5.3.3.1 Via intraperitoneal .....	46
5.3.3.1 Via oral.....	46
5.3.4 Coleta de sangue periférico e hemograma .....	46
5.3.5 Obtenção de medula óssea femoral .....	47
5.3.6 Teste do micronúcleo.....	48
5.3.7 Análises Estatísticas.....	48
<b>5.4 RESULTADOS</b> .....	49
5.4.1 Eritrograma .....	49
5.4.1.1 Via oral.....	49
5.4.1.2 Via i.p.....	50
5.4.1.3 Via oral x Via i.p. ....	51
5.4.2 Leucograma.....	51
5.4.2.1 Via oral.....	51

5.4.2.2	Via i.p.....	52
5.4.2.3	Via oral x Via i.p. ....	53
5.4.3	Plaquetograma .....	54
5.4.3.1	Via oral.....	54
5.4.3.2	Via i.p.....	54
5.4.3.3	Via oral x i.p.....	55
5.4.4	Teste do micronúcleo.....	55
5.4.4.1	Via oral.....	55
5.4.4.2	Via i.p.....	56
5.4.4.3	Via oral x Via i.p. ....	57
<b>5.5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69

<b>6</b>	<b>CAPÍTULO II - Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos esporos-cristais do <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> administrados por via oral em doses simples e combinadas.</b> .....	73
<b>6.1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	73
<b>6.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	74
<b>6.3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	75
6.3.1	Obtenção das toxinas esporo-cristal .....	75
6.3.2	Camundongos.....	75
6.3.3	Administração via oral (p.o.).....	75
6.3.4	Coleta de sangue periférico.....	76
6.3.5	Obtenção de medula óssea femoral .....	77
6.3.6	Teste do Micronúcleo .....	77
6.3.7	Análises Estatísticas.....	78
<b>6.4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	79
6.4.1	Eritrograma .....	79
6.4.1.1	Tempo de 24 horas .....	79
6.4.1.1.1	Avaliação nas doses simples .....	79
6.4.1.1.2	Avaliação nas doses combinadas.....	80
6.4.1.1.3	Avaliação entre doses simples e combinadas.....	80
6.4.1.2	Tempo de 72 horas .....	80
6.4.1.3	Tempo de 7 dias.....	81
6.4.1.4	Entre o tempo de 24 h e 72 horas .....	81
6.4.1.5	Entre o tempo de 24 h e 7 dias .....	82
6.4.1.6	Entre o tempo de 72 h e 7 dias .....	82
6.4.2	Leucograma.....	82
6.4.2.1	Tempo de 24 horas .....	82
6.4.2.1.1	Avaliação nas doses simples .....	82
6.4.2.1.2	Avaliação nas doses combinadas.....	83
6.4.2.1.3	Avaliação entre doses simples e combinadas.....	83
6.4.2.2	Tempo de 72 horas .....	83
6.4.2.3	Tempo de 7 dias.....	83
6.4.2.4	Entre o tempo de 24 h e 72 horas .....	84
6.4.2.5	Entre o tempo de 24 h e 7 dias .....	84
6.4.2.6	Entre o tempo de 72 h e 7 dias .....	84
6.4.3	Plaquetograma .....	85
6.4.3.1	Tempo de 24 horas .....	85
6.4.3.1.1	Avaliação nas doses simples .....	85

6.4.3.1.2	Avaliação nas doses combinadas.....	86
6.4.3.1.3	Avaliação entre doses simples e combinadas.....	86
6.4.3.2	Tempo de 72 horas .....	87
6.4.3.3	Tempo de 7 dias.....	87
6.4.3.5	Entre o tempo de 24 h e 72 horas .....	87
6.4.3.5	Entre o tempo de 24 h e 7 dias .....	88
6.4.3.6	Entre o tempo de 72 h e 7 dias .....	88
6.4.4	Teste do Micronúcleo .....	88
6.4.4.1	Tempo de 24 horas .....	88
6.4.4.1.1	Avaliação nas doses simples .....	88
6.4.4.1.2	Avaliação nas doses combinadas.....	89
6.4.4.1.3	Avaliação entre doses simples e combinadas.....	90
<b>6.4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>98</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO FINAL</b> .....	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>110</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>111</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>120</b>

## CONSIDERAÇÕES AO LEITOR

Esta Dissertação está dividida em Introdução Geral, Revisão de Literatura, Hipóteses, Objetivos Gerais, Capítulos, Discussão Geral, Conclusão, Perspectivas e Referências Bibliográficas. Ela foi subdividida em capítulos para facilitar a leitura e a compreensão dos resultados. Cada capítulo apresenta Introdução, Objetivos Específicos, Material e Método, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. Assim:

O item 5 corresponde ao Capítulo I – Avaliação da hematotoxicidade e da genotoxicidade de esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis kurstaki* administrados por via oral e via intraperitoneal em camundongos Swiss.

O item 6 corresponde ao Capítulo II - Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis kurstaki* administrados por via oral em doses simples e combinadas.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura alcançou um grande sucesso pelo uso contínuo e indiscriminado de agrotóxicos, principalmente entre as décadas de 1940 e 1960 (FEDERICI, 2005). Entretanto, essa medida de controle de pragas culminou em resultados maléficos tais como a seleção de populações resistentes de insetos-praga, comprometendo a eficiência do controle e obrigando os produtores a utilizarem doses cada vez mais elevadas (MONNERAT *et al.*, 2000; BARROS *et al.*, 2006; MONTEIRO; SOUZA, 2010). Além disso, esses inseticidas têm efeitos prejudiciais à saúde humana, destroem a fauna nativa, deixam resíduos nos alimentos e, em inúmeros casos, contaminam o meio ambiente (MONNERAT *et al.*, 2000; BARROS *et al.*, 2006).

Dentre algumas das alternativas viáveis para a substituição dos agrotóxicos sintéticos, como os organoclorados e os fosforados prejudiciais ao meio ambiente e ao organismo humano, agentes biológicos entomopatógenos representam um potencial de uso em programas de controle biológico e produção integrada, pois deixam poucos resíduos e causam pouco impacto sobre os inimigos naturais e o meio ambiente (MONNERAT *et al.*, 2000; BRAVO *et al.*, 2007; KLETER *et al.*, 2007). Neste contexto, *Bacillus thuringiensis* (Bt) é o biopesticida mais importante vendido no mundo inteiro (OECD, 2007; MONNERAT *et al.*, 1999), sendo utilizado há mais de 40 anos pelos produtores orgânicos através de pulverizações como inseticida foliar (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998; GRISOLIA, 2005). Apesar da sensibilidade aos raios ultravioleta e da baixa persistência (MONTEIRO e SOUZA, 2010), a utilização deste bioinseticida no combate de predadores das Ordens Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera, Coleoptera, Diptera e Lepdoptera, principais causadores dos prejuízos para a agricultura, têm se mostrado consideravelmente eficaz (ARONSON *et al.*, 1986; GLARE; O'CALLAGHAN, 1998).

Entretanto, os avanços da biotecnologia levaram à obtenção de plantas geneticamente modificadas que expressam a  $\delta$ -endotoxina do Bt (FISCHHOFF *et al.*, 1987; RAMIRO; FARIA, 2006; OECD, 2007). Assim, tal gene tem sido amplamente clonado em plantas de cultivo extensivo e grandes quantidades dessa toxina são liberadas no meio ambiente, sendo que seus efeitos adversos são ainda pouco conhecidos (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998; GRISOLIA, 2005; RAMIRO; FARIA, 2006).

A ameaça primária à eficácia a longo prazo de toxinas Bt é a evolução da resistência por pragas (SOBERÓN *et al.*, 2007). O risco de ocorrer aquisição de resistência pelo uso de plantas Bt poderá inviabilizar o agricultor que pulveriza o bioinseticida. Além do mais, não se

pode fazer uma análise comparativa do uso de Bt através de pulverização pelos agricultores com as plantas Bt geneticamente modificadas por se tratarem de vias distintas (OECD, 2007). As toxinas Bt podem ser liberadas no solo pelas raízes das plantas ou pela decomposição de sobras das colheitas (CLARK *et al.*, 2005). Os cultivos contínuos destas plantas transgênicas excedem a capacidade de inativação biótica e abiótica, uma vez que em solos dos tipos clay e húmico as toxinas Bt são mais adsorvidas, dificultando a sua degradação microbiológica (GRISOLIA, 2005). Portanto, há possibilidade do gene Bt ser incorporado por microrganismos do solo após a decomposição de plantas remanescentes das lavouras Bt, ocorrendo uma transferência horizontal (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998; GRISOLIA, 2005; OECD, 2007).

Além da preocupação com o aparecimento de insetos resistentes e com a transferência horizontal do gene, outros aspectos devem ser considerados, dentre os quais, podem ser destacados: (1) a toxicidade para organismos não-alvo (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998; GRISOLIA, 2005); (2) a persistência da toxina Bt e a estabilidade do gene Bt em ambientes aquáticos (DOUVILLE *et al.* 2007); e (3) a exposição de humanos e animais em níveis de Bt potencialmente tóxicos através da dieta (SÉRALINI *et al.*, 2007).

Até o momento, existem poucos estudos sobre a citotoxicidade das toxinas Bt para os diferentes organismos. Devido ao seu crescente uso nas atividades agrícolas, a sua presença já é detectada em diferentes compartimentos ambientais como solo e água (OECD, 2007). Além disso, as proteínas Cry vêm sendo investigadas com potencial para adjuvantes de mucosas, sendo uma das prováveis aplicações à elaboração de vacinas para mamíferos (VÁZQUEZ-PADRÓN *et al.*, 1999). Logo, os riscos sobre organismos não-alvo devem ser averiguados por questões de biossegurança. Conseqüentemente, por essas questões, é necessário avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade dessas toxinas Bt para os organismos não-alvo sob diferentes vias de administração e em diferentes ecossistemas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

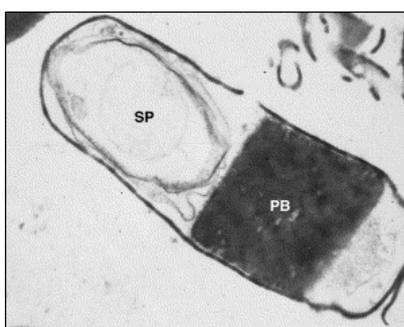
### 2.1 *Bacillus thuringiensis* BERLINER

#### 2.1.1 Características

*Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) é uma bactéria de solo (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; BOBROWSKI *et al.*, 2002) e de ocorrência ubíqua (KRYWUNCZYK; FAST, 1980), Gram-positiva, em forma de bastonete, flagelada, aeróbica ou anaeróbica facultativa (OECD, 2007), pertencente à família Bacillaceae e ao complexo taxonômico *B. cereus* (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998). Na fase estacionária do seu ciclo de crescimento caracteriza-se por entrar em processo de esporulação sintetizando inclusões protéicas inseticidas (**Fig. 1**) (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; BHATTACHARYA, 1993).

Os cristais protéicos parasporal formados são  $\delta$ -endotoxinas (ARMSTRONG *et al.*, 1985) denominadas de proteínas cristal (Cry) e proteínas citolíticas (Cyt) (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; OECD, 2007), que conferem ao *B. thuringiensis* atividade entomopatogênica (De MAAGD *et al.*, 2003). As  $\delta$ -endotoxinas são sintetizadas por diferentes subespécies de *B. thuringiensis* e a mesma estirpe pode fornecer mais de um tipo de Cry (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998; FERRÉ; VAN RIE, 2002).

Os cristais inseticidas podem ser ativados no trato digestório alcalino de grupos específicos de pequenos invertebrados (MARROQUIN *et al.*, 2000; KOTZE *et al.*, 2005) e de insetos das Ordens Himenoptera, Homoptera, Orthoptera, Coleoptera, Diptera, Lepidoptera (SCHNEPF *et al.*, 1998; HORI *et al.*, 2000; FERRÉ; VAN RIE, 2002). Há décadas são empregados como importantes bioinseticidas de agregado valor econômico no controle biológico de pragas agrícolas e a determinados vetores de doenças humanas (De MAAGD *et al.*, 2003).



**Fig. 1:** Micrografia eletrônica de transmissão do *B. thuringiensis* (Bt) (2  $\mu$ m) em fase de esporulação. SP- esporo; PB (corpo proteico;  $\delta$ -endotoxina) (Adaptado de De Maagd *et al.*, 2001).

### 2.1.2 Contextualização Histórica

O primeiro isolado de *B. thuringiensis* data de 1901, quando o biólogo japonês Ishiwata descobriu uma bactéria esporulante causadora da doença “sotto-disease”, letal à larva do bicho-da-seda, *Bombyx mori*. Em 1908, Iwabuchi denominou-a de *Bacillus sotto* Ishiwata (WHITELEY; SCHNEPF, 1986). Só em 1911, o microbiologista alemão Berliner fez a sua descrição oficial. Berliner relatou a existência de cristais em um mesmo tipo de bactéria que foi isolada de larvas de lepidópteras, *Anagasta kuehniella*, em Thuringia, Alemanha. No ano de 1915 ele intitulou-a de “*Bacillus thuringiensis*” (Bt) em tributo ao local em que foi encontrada (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; OECD, 2007).

Em 1938, na França, a primeira formulação comercial em “spray” à base de Bt foi desenvolvida, a “Sporeine” (FEDERICI, 2005). O produto era elementar, de baixa seletividade e com diversas restrições, dentre as quais, a acentuada degradação pelos raios ultravioleta (UV) e a ação limitada a pouquíssimas espécies (De MAAGD *et al.*, 1999a). Só em 1961, nos Estados Unidos, é que foi obtida a primeira marca registrada formulada a partir desse bacilo (FEDERICI, 2005; OECD, 2007).

Na década de 60 também foram descobertas outras subespécies, e uma nova estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) foi isolada (DULMAGE, 1970). A identificação da primeira estirpe tóxica para dípteros só aconteceu em 1977, quando a Organização Mundial da Saúde (OMS) isolou de larvas de mosquitos da malária, em Israel, o *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) (GLARE; O’CALLAGHAN, 1998). Em 1983, houve ampliação na abrangência tóxica de Bt com a descrição do *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt), eficaz para coleópteras (KRIEG *et al.*, 1983).

Ao longo da década de 90 a economia mundial foi elevada com a identificação de cepas mais seletivas às pragas agrícolas (DIAS, 1992; PIGOTT; ELLAR, 2007). Em detrimento ao uso de inseticidas químicos (HÖFTE; WHITELEY, 1989; FEDERICI, 2005), os produtos de Bt têm sido uma das alternativas viável e eficiente, que ao contrário desses herbicidas, são considerados não-contaminantes ao meio ambiente e inofensivos à saúde humana (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; BRAVO *et al.*, 2005).

A forma mais recente de manipulação do *B. thuringiensis* é a clonagem dos seus genes *cry* - responsáveis pela codificação das proteínas Cry - em plantas de cultivo extensivo (De MAAGD *et al.*, 1999b; ESTRUCH *et al.*, 1997). Os avanços na biologia molecular como o ácido desoxirribonucléico-recombinante (ADN-recombinante) (OECD, 1986; BOBROWSKI *et al.*, 2003) permitiram a modificação de plantas expressando estes genes, que inicialmente

foram expressos no tabaco (VAECK *et al.*, 1987) e no tomate (FISHHOFF, 1987), mas que atualmente são empregados em diversas culturas, das quais se destacam o milho, o algodão e a soja (HUANG *et al.*, 2003; KLETER *et al.*, 2007; ARJUNAN; QAIM, 2009).

## 2.2 TOXINAS PRODUZIDAS pelo *B. thuringiensis*

Além das  $\delta$ -endotoxinas Cry e Cyt o *B. thuringiensis* pode sintetizar outros fatores de virulência como as  $\alpha$ -exotoxinas, as  $\beta$ -exotoxinas, as hemolisinas, as henterotoxinas, as exoenzimas e as proteínas Vips (HANSEN; SALAMITOU, 2000; OECD, 2007). Essas toxinas, bem como os esporos podem ter ação sinérgica quando combinados às  $\delta$ -endotoxinas (OECD, 2007). Do mesmo modo, combinações entre proteínas Cry e Cyt são complexas e dependendo da condição resultam em sinergismo ou, então, em efeito antagônico (PARK *et al.*, 1995; SCHNEPF, 1998).

### 2.2.1 $\delta$ -endotoxinas – Cry e Cyt

As  $\delta$ -endotoxinas estão classificadas em 56 grupos de proteínas Cry (Cry1 a Cry56) e em dois grupos de proteínas Cyt (Cyt1 e Cyt2). Suas atualizações podem ser verificadas pelo site “[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/)”. As proteínas Cyt são citolisinas de ação inespecífica e com afinidade por ácidos graxos de cadeias insaturadas na porção lipídica da membrana celular (THOMAS; ELLAR, 1983). As Cyt não têm homologia com proteínas Cry e apresentam peso molecular inferior, de 25 a 28 kDa (POLANCZYK *et al.*, 2003). No entanto, possuem um espectro tóxico maior, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (GLARE; O’CALLAGHAM, 2000).

### 2.2.2 $\alpha$ -Exotoxinas

As  $\alpha$ -exotoxinas são enzimas citolíticas também denominadas de fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase, que atuam sobre os fosfolipídeos de membranas celulares (FAUST; BULLA Jr., 1982). Caracterizam-se por serem termolábeis, solúveis em água, extremamente tóxicas quando administradas via oral ou via intra-hemocélica em algumas espécies de insetos, além de apresentarem-se tóxicas para ratos e outros vertebrados (HANSEN; SALAMITOU, 2000).

### 2.2.3 $\beta$ -Exotoxina

A  $\beta$ -exotoxina ou thuringiensina é sintetizada durante a fase vegetativa e caracteriza-se por se apresentar termoestável e com baixa massa molecular. Encontra-se em dois tipos: o tipo I e o tipo II (FARKAS *et al.*, 1969).

A  $\beta$ -exotoxina do tipo I é composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico. Sua atividade tóxica é exercida pela competição com o ATP, inibindo a ação da RNA polimerase e, conseqüentemente, a biossíntese de RNA. (FARKAS *et al.*, 1969). São mais abrangentes que as  $\delta$ -endotoxinas e extremamente agressivas. Podem ter efeitos nocivos sobre outros invertebrados e serem mutagênicas ou teratogênicas a certos vertebrados, incluindo mamíferos (HANSEN; SALAMITOU, 2000). A  $\beta$ -exotoxina do tipo II tem analogia ao UTP e é mais tóxica que a anterior, especialmente para coleópteras (LEVINSON *et al.*, 1990).

Os genes codificadores das  $\beta$ -exotoxinas estão localizados em plasmídeos de 75 ou 110 MDa (LEVINSON *et al.*, 1990). São mais tóxicas que as do tipo I e por este motivo há restrições na produção comercial de bioinseticidas que empregam essas toxinas nas suas formulações (HANSEN; SALAMITOU, 2000; OECD, 2007).

### 2.2.4 Exoenzimas

As exoenzimas são responsáveis por favorecerem a inserção das  $\delta$ -endotoxinas ao epitélio intestinal do hospedeiro por meio da ruptura da membrana peritrófica. Neste grupo destacam-se as quitinases e as proteases (REDDY *et al.*, 1998).

### 2.2.5 Proteínas Vegetativas Inseticidas - Vips

Enquanto as  $\delta$ -endotoxinas são sintetizadas especialmente na fase esporulante (ARMSTRONG *et al.*, 1985; BHATTACHARYA, 1993), a maioria das proteínas inseticidas Vips são formadas no estado vegetativo do bacilo. As Vips não formam cristal parasporal e são aparentemente secretadas das células (SCHNEPF *et al.*, 1998). Podem ser encontradas em cepas de *B. thuringiensis* e *B. cereus* (MONNERAT; BRAVO, 2000) e os seus genes codificadores (genes *vips*) parecem estar localizados em plasmídeos de alta massa molecular, juntamente às proteínas Cry (ESTRUCH *et al.*, 1996; SCHNEPF *et al.*, 1998).

A primeira classe de proteínas Vips isolada foi a Vip3A de aproximadamente 88 kDa de peso molecular (ESTRUCH *et al.*, 1996; SCHNEPF *et al.*, 1998). São tóxicas

principalmente para lepidópteros das espécies *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* e *Hepicoverpa zea* (YU *et al.*, 1997; LOGUERCIO *et al.*, 2002). Classificam-se em Vip3A(a) e Vip3A(b) e intoxicam insetos-praga de forma similar às proteínas Cry, mas sem nenhuma homologia estrutural a elas (YU *et al.*, 1997; OECD, 2007; RANG *et al.*, 2005).

### 2.3 PROTEÍNAS Cry

As proteínas Cry ou ICPs (do inglês “Insecticidal Crystal Proteins”), também chamadas de toxinas Cry, são prototoxinas que contêm inclusões cristalinas parasporal sintetizadas durante os estágios III e IV da fase esporulação e ativam-se em condições de pH alcalino normalmente superior a 8,0 nos organismos-alvo (HÖFMAN *et al.*, 1988). Elas pertencem à classe  $\alpha$ -hélice das toxinas formadoras de poros (TFP) que se caracterizam pela solubilidade em água permitindo modificações conformacionais das suas cadeias, favorecendo inserção ou translocamento na membrana celular do hospedeiro, provocando sua morte (PARKER; FEIL, 2005; BRAVO *et al.*, 2006).

A massa molecular das Cry variam de 40 a 140 kDa (HÖFTE; WHITELEY, 1989; SERAFIN *et al.*, 2002), no entanto a maioria das estirpes de elevado potencial inseticida tem o equivalente 130 kDa (PIGOTT; ELLAR, 2007), como as Btk HD1. As Cry são codificadas por genes *cry* e uma mesma cepa de Bt pode produzir até dois cristais, que podem conter uma ou mais toxinas com peso molecular variado. Algumas delas apresentam um único gene codificador, enquanto outras apresentam genes diferentes, embora, relacionados (**Quadro 1**) (JAOUA *et al.*, 1996; SANCHIS *et al.*, 1998).

Subespécies	Estirpes	Proteínas Cry
<i>aizawai</i>	616, 1257, 1295, 1576	1Aa, 1Ab, 1Ad, 1Ac, 1Da, 1Eb, 1Fa, 9E, 30Aa, 40Aa
<i>entomocidus</i>	456, 1185, 1266, 1270, 1306, 1456	1Aa, Ba, 1Ca, 1Ib, 30Ba, 44Aa
<b>*<i>kurstaki</i></b>	49, 73, 93, 121, 128, 546, 570, 603, 604, 605, 606, 607, 609, 610, 611, 699, 701, 764, 1172, 1176, 1186, 1187, 1188, 1189, 1190, 1191, 1201, 1202, 1203, 1205, 1209, 1210, 1258, 1264, 1300, 1450, 1905	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 1Ia, 2Aa, 2Ab</b>
<i>sotto</i>	615, 1175, 1192, 1204, 1256, 1263, 1297, 1305	

**Quadro 1** – Subespécies do *Bacillus thuringiensis* armazenadas no Banco de Germoplasma da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEM), com as suas respectivas estirpes e proteínas sintetizadas por elas. \*Em destaque, a subespécie *kurstaki* e as Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, empregadas neste estudo.

### 2.3.1 Classificação das estirpes

No final da década de 80 Höfte e Whiteley (1989) propuseram uma classificação para as toxinas de Bt baseada na estrutura primária de suas proteínas e no espectro inseticida. Foram classificadas 38 toxinas, agrupadas em 14 classes diferentes. As principais delas estavam divididas em (I) atividade tóxica para Lepidoptera, (II) tóxica para Lepidoptera e Diptera, (III) tóxica para Coleoptera, (IV) tóxica para Diptera. Na década seguinte, Crickmore *et al.* (1998) propuseram o atual modo de classificação que agrupa as toxinas de acordo com as seqüências de aminoácidos similares, independentemente da atividade inseticida exercida por elas.

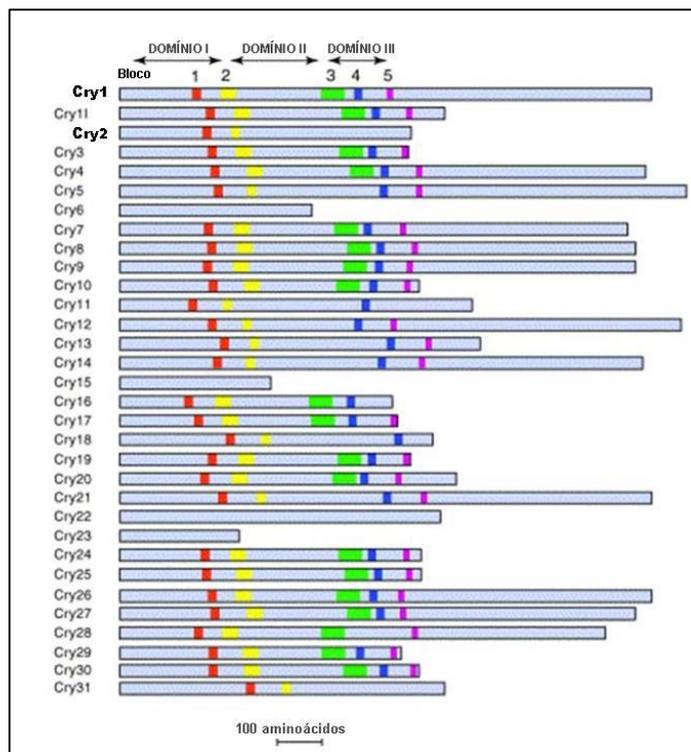
Tanto as Cry quanto as Cyt estão agrupadas em quatro níveis hierárquicos e suas respectivas nomenclaturas são representadas pelo nome da toxina seguido de números arábicos, por uma letra maiúscula, uma minúscula e números (ex.: Cry23Aa1), conforme a sua posição filogenética (CRICKMORE *et al.*, 1998; De MAAGD, *et al.*, 1999 b). Quando as proteínas apresentam menos de 45% de sua identidade na seqüência de aminoácidos, diferem-se na primeira categoria (ex.: Cry23), a segunda com até 78% de identidade apresentam-se com números e uma letra maiúscula (ex.: Cry23A), a terceira com até 95% são descritas por números e letras (ex.: Cry23Aa) e, com identidade superior a 95%, são caracterizadas por todos os quesitos (ex.: Cry23Aa2) (CRICKMORE *et al.*, 1998; De MAAGD *et al.*, 1991; BRAVO, 2007).

O Bt tem sido diferenciado entre si ou das demais espécies do complexo *B. cereus* por várias associações de métodos fenotípicos, incluindo-se a sorotipagem flagelar (de BARJAC e FRACHON, 1990), a cromatografia líquida (YAMOTO, 1983), os bioensaios, as reações bioquímicas (HANSEN *et al.*, 1996). A sorotipagem flagelar soro H é o método comumente empregado para a diferenciação de suas subespécies e variedades (HORI *et al.*, 2000), embora não informe necessariamente a presença de  $\delta$ -endotoxinas (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998).

A diferenciação bioquímica, por outro lado, nem sempre corresponde à caracterização da sorotipagem, o que dificulta a classificação. Por isso, a utilização de técnicas moleculares, tais como Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), Polimorfismo de ADN Amplificado ao Acaso (RAPD, do inglês “*Random amplified polymorphic DNA*”), hibridização de ADN e sondas baseada no ácido ribonucléico ribossomal (ARNr), é fundamental para a caracterização intra e interespecífica, bem como, a identificação de proteínas tóxicas das estirpes isoladas (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998).

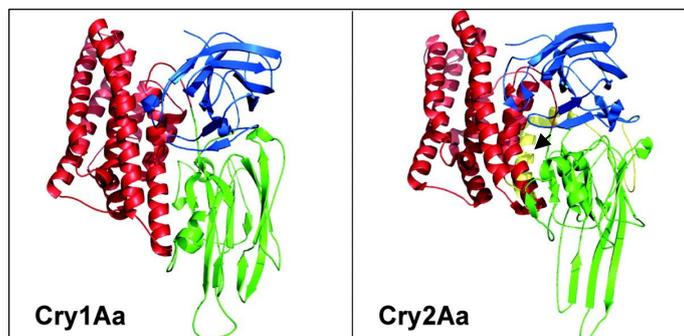
### 2.3.2 Estrutura tridimensional das Cry

As cadeias polipeptídicas das Cry são formadas por duas regiões distintas de protoxinas, a amino-terminal (N-terminal), geralmente variável, e a carboxi-terminal (C-terminal), mais conservada (GILL *et al.*, 1992; SCHNEPF *et al.*, 1998). O domínio C-terminal está relacionado com a forma da estrutura do cristal, enquanto que a toxicidade está atrelada à sua porção N-terminal (HÖFTE; WHITELEY, 1989; LI *et al.*, 1991). Em N-terminal há sequências de aminoácidos de até cinco blocos altamente conservados que, possivelmente, estão associados com a sua estabilidade e a sua função biológica (**Fig. 2**) (HÖFTE; WHITELEY, 1989; De MAAGD *et al.*, 2001).



**Fig. 2:** Estrutura ativa das proteínas Cry (Domínios I, II, III) apresentando seqüências de blocos altamente conservados (retângulos coloridos), destaque para Cry1 e Cry2 (Adaptado de De Maagd *et al.*, 2001).

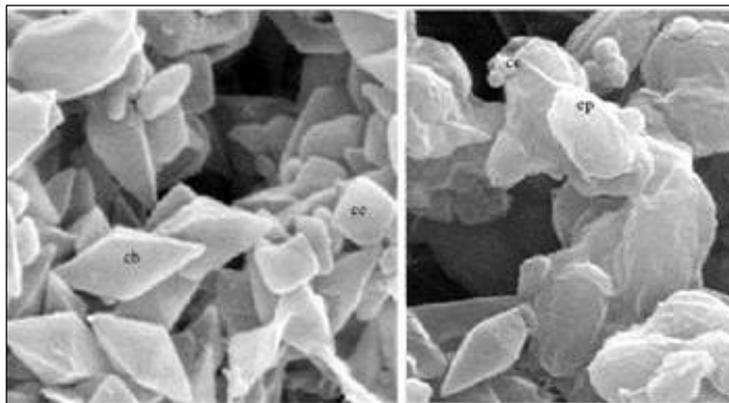
As moléculas da parte ativa das Cry são constituídas de três domínios, todas as estruturas com um alto grau de similaridade (BRAVO *et al.*, 2007). As estruturas terciárias de Cry1Aa e Cry2Aa foram observadas por cristalografia de raios X (PIGGOT; ELLAR, 2007). Foi verificada a presença de três regiões estruturais, cada qual com aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos (BRAVO *et al.*, 2002). O domínio N-terminal I é o responsável pela inserção da toxina à membrana e constitui-se de sete  $\alpha$ -hélices antiparalelas; o domínio II N-terminal contém os receptores responsáveis pela ligação da toxina à membrana e é formado por duas folhas  $\beta$ -antiparalelas e duas  $\alpha$ -hélices curtas; e o C-terminal domínio III é composto de duas folhas  $\beta$ -pregueadas que atuam na proteção da molécula da digestão por proteinases, além da função de receptor (**Fig. 3**) (GILL *et al.*, 1992).



**Fig. 3:** Estruturas das toxinas Cry1Aa e Cry2Aa, por cristalografia e difração de raios-X. O domínio I, em vermelho; o domínio II, em azul; o domínio III, em verde; e em amarelo (indicado pela seta), o domínio N-terminal da protoxina Cry2Aa (adaptado de PIGGOT e ELLAR, 2007).

### 2.3.2.1 Morfologia dos Cristais

Os cristais são produzidos durante a esporulação e acumulam-se em grandes quantidades interna e externa à bactéria (WHITELEY; SCHNEPF, 1986). A forma deles é determinada pelo número de  $\delta$ -endotoxinas presentes e uma relação parcial entre a composição e sua estrutura molecular. A atividade tóxica é associada a diferentes morfologias, tamanhos, números e composição, variando de acordo com a estirpe. Cinco morfologias distintas são conhecidas, dentre as quais: bipiramidal (Cry1); cubóide (típico de Cry2) e associado com cristais bipiramidal; amorfos (Cry4 e proteínas Cyt) (JAOUA *et al.*, 1996; SCHNEPF *et al.*, 1998). Para lepidópteras, normalmente os cristais mais tóxicos são os do tipo bipiramidal (PRAÇA *et al.*, 2004). Quando os cristais são solubilizados, eles exibem efeitos tóxicos contra alvos biológicos. Estes efeitos podem provocar citólise de cultura de linhagens celulares de insetos, hemólises de Eritrócitos de coelhos e letalidade a camundongos (THOMAS; ELLAR, 1983).



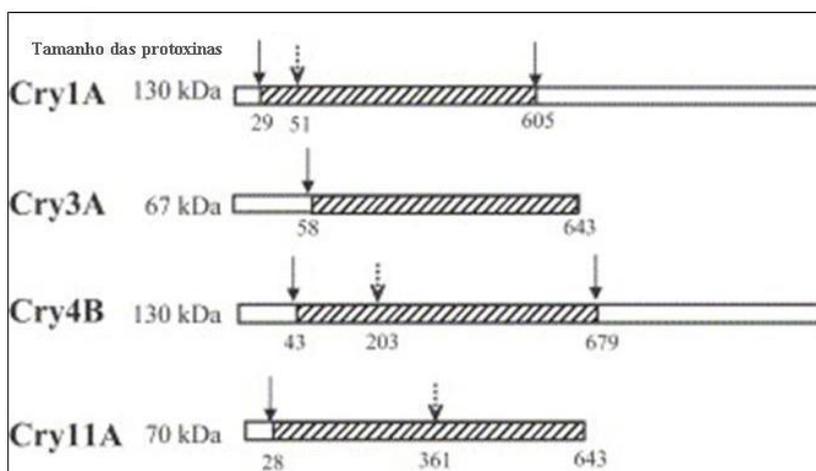
**Fig. 4:** Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S997. cb: cristal bipiramidal; cc: cristal cubóide; ce: cristal esférico; ep: esporo (aumento de 10.000 x) (adaptado de PRAÇA *et al.*, 2004).

### 2.3.3 Mecanismo de ação

De modo geral, estudos sobre o mecanismo de ação das proteínas Cry sobre insetos-praga são retratados, principalmente, para a Ordem Lepidoptera (MONNERAT *et al.*, 1999; BRAVO *et al.*, 2007) As Cry apresentam-se como protoxinas e são ativadas no trato digestório alcalino de insetos suscetíveis que, após a ingestão dos esporos-cristais, manifestam perda de apetite, rejeição ao alimento, seguido de paralisia intestinal, vômito, diarreia, paralisia total, alcançando o óbito (ARONSON, *et al.*, 1986). Embora a atividade inseticida de cada estirpe seja efetiva para determinada classe de insetos, a similaridade na

estrutura dos seus domínios faz com que elas tenham o mesmo mecanismo de ação sobre seus hospedeiros (GRIFFITTS; AROIAN, 2005; BRAVO *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação das Cry divide-se em etapas e o processo inicial de solubilização começa quando o cristal, ingerido pela larva, passa pelo intestino médio, solubiliza-se em pH alcalino e sofre ação de proteases que clivam estas protoxinas em sítios específicos, liberando um ou mais fragmentos tóxicos (monômeros de toxinas) de aproximadamente 60kDa (**Fig.5**) (TOJO; AIZAWA, 1983; PRAÇA *et al.*, 2004). A clivagem proteolítica remove a porção N-terminal dos peptídeos e aproximadamente metade da porção C-terminal restante (para cadeias longas), sendo um fator importante que pode contribuir para determinar a sua especificidade ao inseto (GILL *et al.*, 1992; BRAVO *et al.*, 2007).

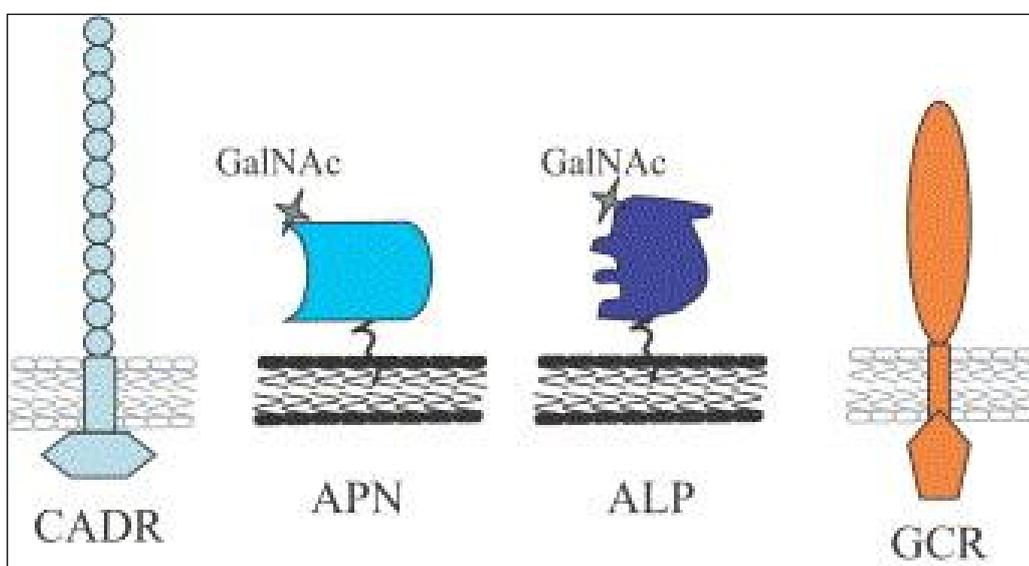


**Fig. 5:** Representação esquemática do processamento proteolítico de algumas proteínas Cry. As caixas brancas representam as protoxinas, enquanto as regiões listradas representam as toxinas ativas. As setas sólidas demonstram os sítios de clivagem nas porções N-terminal e C-terminal das toxinas ativas. As setas listradas mostram clivagens intra-moleculares das proteínas ativas (BRAVO *et al.*, 2007).

Após a ativação, as proteínas Cry hidrolisadas atravessam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos encontrados nas microvilosidades das células colunares do intestino médio e interferem no equilíbrio osmótico formando poros na membrana apical (HOFFMAN *et al.*, 1988; MONNERAT; BRAVO, 2000; De MAAGD *et al.*, 2001). A união receptor-proteína Cry requer uma cinética sofisticada baseada em duas etapas fundamentais, uma reversível e outra irreversível (VAN RIE *et al.*, 1989; GÓMEZ *et al.*, 2007). A primeira envolve a adesão da toxina ao seu sítio de ligação, ou seja, entre a toxina e o carboidrato do receptor, mas não lhe confere atividade essencialmente tóxica (SCHENPF *et al.*, 1998). Na segunda, ocorre uma interação irreversível entre proteína-proteína que contribui decisivamente para a sua toxicidade (MONNERAT; BRAVO, 2000).

Estudos realizados com proteínas da família Cry1A identificaram pelo menos quatro receptores diferentes para as larvas de lepidópteras (**Fig.6**). Uma proteína tipo caderina

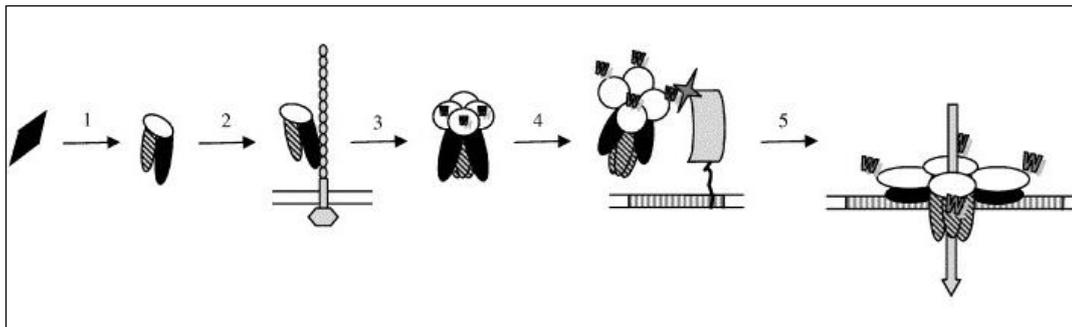
(CADR), uma aminopeptidase-N (APN) e uma fosfatase alcalina (ALP), ambas ancoradas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), e um glicoconjugado (GCR) (BRAVO *et al.*, 2007). Em lepidópteros, os monômeros de Cry1A ligam-se, inicialmente, às proteínas do tipo caderina (Bt-R1) de 210 kDa, expondo a sua  $\alpha$ -hélice à clivagem por proteases da membrana, provocando um encurtamento de até 3kDa no seu tamanho e uma mudança conformacional da sua cadeia (GÓMEZ *et al.*, 2006). Esta mudança facilita a formação de um oligômero, que irá interagir com o segundo receptor APN ou ALP, induzindo a entrada da toxina na membrana e ocasionando a formação de um complexo pré-poro (PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2006).



**Fig. 6:** Quatro moléculas receptoras das proteínas Cry1A. CADR – receptor tipo caderina; APN – Aminopeptidase N; ALP – Fosfatase Alcalina; GCR – receptor glicoconjugado (Adaptado de BRAVO *et al.*, 2007).

Após a interação a receptores específicos, a toxina une-se rapidamente e irreversivelmente à membrana plasmática das células epiteliais do intestino provocando um desequilíbrio no balanço osmótico. Assim, ocorre a formação de poros (1 a 2 nm) que aumentam a permeabilidade da membrana apical e ocasionam o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocele do inseto, levando-o à morte por inanição e septicemia (**Fig. 7**) (DU; NICKERSON, 1996; MONNERAT; BRAVO, 2000).

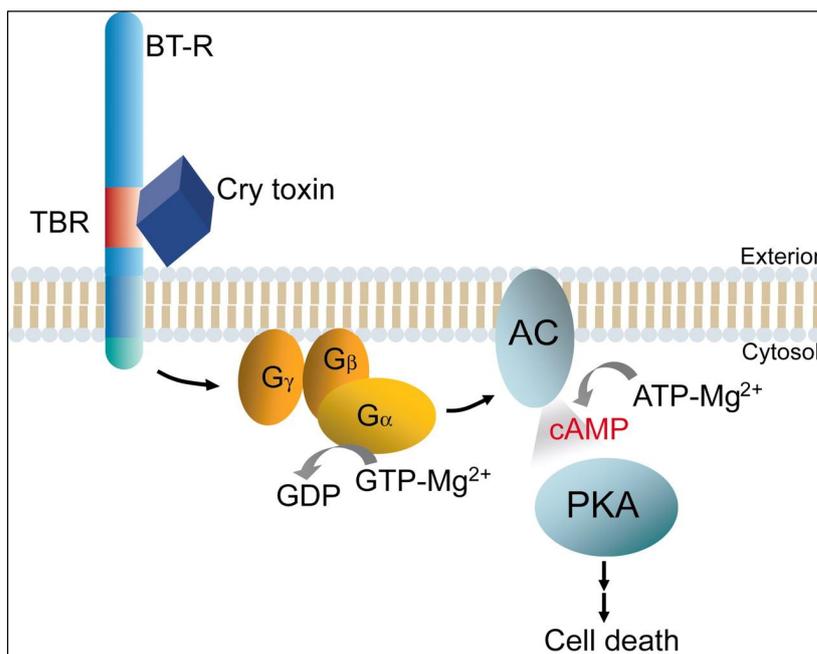
Dois modelos são propostos para explicar a inserção das toxinas às membranas (KNOWLES, 1994).



**Fig. 7:** Mecanismo de ação das toxinas Cry. (1) Solubilização e ativação da proteína. (2) Ligação da toxina monomérica com o primeiro receptor (CADR), mudança conformacional da toxina e clivagem da  $\alpha$ -hélice 1. (3) Ligação da toxina ao segundo receptor (GPI-APN ou GPI-ALP) e mudança conformacional da proteína. (5) Inserção da estrutura oligomérica na membrana e formação do poro (adaptado de BRAVO *et al.*, 2007).

O primeiro é o modelo “canivete” e sugere que as duas hélices do domínio I, afastadas da membrana, girariam do topo do complexo pré-poro e seriam inseridas nela (KNOWLES, 1994). O segundo é o modelo “guarda-chuva”, pelo qual um par de hélices do domínio I, este perto da membrana, seria inserido, enquanto as demais se rearranhariam de forma aberta. Entretanto, recentemente, Nair e Dean (2008) demonstraram que todos os domínios das toxinas Cry1A inserem-se na membrana.

O mecanismo de ação explicitado anteriormente é o mais aceito para demonstrar a atividade tóxica das proteínas Cry em seus hospedeiros, tanto nematóides quanto insetos (BRAVO *et al.*, 2007). No entanto, Zhang *et al.* (2006) sugerem um novo modelo, estudado apenas em insetos, que se baseia na transdução de sinais para descrever estes eventos. O processo de toxicidade é iniciado da mesma forma para ambos. A diferença entre eles, porém, é modo pelo qual ocorrem os eventos associados à membrana celular. No segundo, quando acontece a ligação das proteínas Cry1Ab aos receptores BT-R1, regiões específicas de uma proteína G são imediatamente estimuladas, acionando a adenilato ciclase (AC), que é a responsável pela produção de cAMP. O aumento de cAMP estimula a proteína quinase (PKA), desestabilizando o citoesqueleto celular e canais iônicos provocando a morte da larva (**Fig.8**) (ZHANG *et al.*, 2006).



**Fig. 8:** Esquema do novo modelo proposto para o mecanismo de ação das proteínas Cry – transdução de sinal. A toxina Cry interage com a região de ligação (TBR) do receptor (BT-R), estimulando a proteína G e a adenilato ciclase (AC), promovendo cAMP intracelular. A proteína quinase (PKA) é acionada, desestabilizando o citoesqueleto e canais iônicos, provocando assim, a morte celular (adaptado de ZHANG *et al.*, 2006).

## 2.4 CULTIVARES Bt-TRANSGÊNICOS E BIOSSEGURANÇA

Plantas geneticamente modificadas (GM) contêm um ou mais genes transferidos de diferentes espécies. Deliberadamente, elas têm sido desenvolvidas por múltiplas razões, dentre as quais resistência a doenças, resistência a pestes, tolerância a herbicidas (O'CALLAGHAN *et al.*, 2005). A produção de cultivares transgênicos aumenta cerca de 10% ou mais a cada ano e estima-se que aumentará ainda mais nas próximas décadas (OECD, 1992; O'CALLAGHAN *et al.*, 2005; ICOZ; STOTZKY, 2008).

Os níveis e a localização da expressão gênica na planta GM podem ser regulados, permitindo a presença contínua da toxina em todas as partes da planta ou em algumas mais relevantes (OECD, 2007). O ideal seria, por questões de biossegurança, que estas expressões ocorressem em partes que não fossem destinadas ao consumo (ICOZ; STOTZKY, 2008).

## 2.5 RESISTÊNCIA DE INSETOS AO *Bacillus thuringiensis*

Por décadas nenhum caso de desenvolvimento de resistência no campo havia sido relatado e os testes que se apresentaram positivos para alguns insetos foram conduzidos em

laboratório. Alguns autores atribuíram a este episódio o baixo nível de persistência de Bt no ambiente (HÖFTE; WHITELEY, 1989). Por outro lado, mais de 500 espécies de insetos já se tornaram resistentes a pelo menos uma das formulações dos inseticidas sintéticos (VAN RIE, 2000). Por isso, vem emergindo uma preocupação internacional sobre a resistência de insetos-praga também para as toxinas de Bt e a velocidade com que isso acontecerá (GILL *et al.*, 1992; De MAAGD *et al.*, 1999b).

No ano de 1985 foi verificado, em laboratório, o primeiro caso de resistência a uma formulação de Bt após exposição de um inseto da Ordem Lepidoptera, *Plodia interpunctella*, ou popularmente, traça indiana da farinha. Porém, a observação da primeira situação em campo ocorreu no Hawaii, em uma população de *Plutella xylostella*, que apresentou diferentes níveis de suscetibilidade a produtos a base de Bt (PRAÇA *et al.*, 2007). Atualmente, existe a hipótese de que o amplo manejo de cultivares Bt tenha sido o fundamental precursor para o aparecimento de populações resistentes às toxinas (TABASHINK *et al.*, 2008).

Exposição de populações de insetos a toxinas simples, depois de tê-los expostos a misturas complexas, como vem ocorrendo para as formulações de Bt, pode resultar em um rápido aumento da resistência e uma provável falência de Bt como agente de controle de insetos-pragas (GILL *et al.*, 1992). A resistência pode estar associada a diversos fatores, dentre eles genéticos e ambientais. O modo de ação das toxinas sugere hipóteses de mecanismos de resistência, tais como a mudança conformacional dos receptores; pH com menor alcalinidade que dificultaria a solubilização dos cristais; proteases intestinais ineficientes para a ativação das  $\delta$ -endotoxinas ou então extremamente eficazes a ponto de digerí-las completamente (MONNERAT; BRAVO, 2000; VAN RIE 2000).

Portanto, a compreensão na relação entre estrutura e função da toxina e o inseto-alvo auxiliará em estratégias para se combater a resistência de espécies susceptíveis (GILL *et al.*, 1992). Várias táticas poderão ser utilizadas no manejo de resistência: expressão de toxinas apenas nas partes da planta atacadas pelo inseto; expressão de altas doses; rotação de culturas com expressão de toxinas diferentes ou a expressão concomitante de ambas na mesma planta (TABASHNIK, 1994; VAN RIE, 2000).

## 2.6 REGULAMENTAÇÃO PARA REGISTRO DE AGENTES MICROBIOLÓGICOS EM TERRITÓRIO NACIONAL

Há preocupação de autoridades locais e internacionais acerca da utilização de agentes microbiológicos para práticas de manipulação genética em prol da agricultura ou pra outros fins (PINTO; FIUZA, *et al.*, 2008). No âmbito nacional há constante elaboração de decretos e normas para regulamentar a manipulação desses microrganismos em nosso território.

O Decreto 4.074, de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei 7.802 sobre agrotóxicos, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Nos usos das suas atribuições, define (BRASIL, 2002):

- Agente biológico de controle - o organismo vivo, de ocorrência natural ou obtido por manipulação genética, introduzido no ambiente para o controle de uma população ou de atividades biológicas de outro organismo vivo considerado nocivo.
- Entende-se por agrotóxicos e afins - 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 planadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cujas finalidades seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Ainda de acordo com o Decreto 4.074/2002, no seu Artigo 6º, Parágrafo § 3º, cabe ao Ministério da Saúde realizar avaliação toxicológica preliminar dos agrotóxicos, produtos técnicos, pré-misturas e afins, destinados à pesquisa e à experimentação. Na Seção I, Do Registro do produto (Art. 8º), os agrotóxicos, seus componentes e afins só poderão ser produzidos, manipulados, importados, exportados, comercializados e utilizados no território nacional se previamente registrados no órgão federal competente, atendidas as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores de agricultura, saúde e meio ambiente. Assim sendo, o registro de novo produto de agrotóxico, seus componentes e afins

somente será concedido se a sua ação tóxica sobre o ser humano e o meio ambiente for, comprovadamente, igual ou menor do que a daqueles já registrados para o mesmo fim (Art. 20). Art. 20, Parágrafo único, os critérios de avaliação serão estabelecidos em instruções normativas complementares dos órgãos competentes, considerando prioritariamente os seguintes parâmetros:

I – toxicidade;

II – presença de problemas toxicológicos especiais, tais como: neurotoxicidade, fetotoxicidade, ação hormonal e comportamental e ação reprodutiva;

III – persistência no ambiente;

IV – bioacumulação;

V – forma de apresentação; e

VI – método de aplicação.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também criou uma resolução com normas para a regulamentação de produtos biológicos, a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 194, de 8 de julho de 2002. Em seu Art. 1º, inciso I, definiu, dentre outros (ANVISA, 2002):

I – agentes microbiológicos de controle - os microrganismos vivos de ocorrência natural, bem como aqueles resultantes de técnicas que impliquem na introdução direta, num organismo, de material hereditário, desde que não envolvam a utilização de moléculas de ácido desoxirribonucléico (ADN) e/ou de ácido ribonucléico (ARN) recombinante ou organismo geneticamente modificado (OGM).

IV - toxicidade - injúria ou dano causado ao hospedeiro, por um veneno ou toxina, independente da infecção, da replicação ou da viabilidade do microrganismo. V - toxina - substância tóxica, gerada por um microrganismo, planta ou animal, capaz de causar injúria ou dano ao interagir com as células do hospedeiro.

Diante da preocupação em se adotarem medidas de controle e a necessidade de estabelecer uma norma específica para se regulamentar o registro de produtos microbiológicos, mais recentemente vários órgãos de competência federal, tais como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a ANVISA, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) criaram a Instrução Normativa Conjunta – INC 3, de 10 de março de 2006. Em seu Art. 7º, diz que os produtos que apresentarem infectividade ou patogenicidade a organismos não-alvo serão avaliados conforme a Fase III descrita no Anexo III - AVALIAÇÃO TÓXICOLÓGICA E DA PATOGENICIDADE. O objetivo é avaliar efeitos adversos do produto técnico e/ou

formulado sobre mamíferos. Os principais aspectos a serem considerados são (BRASIL, 2006):

1 - patogenicidade do agente microbiológico de controle e de contaminantes microbianos;

2 - infectividade/persistência do agente microbiológico de controle e de contaminantes microbianos;

3- toxicidade do agente microbiológico de controle, de contaminantes microbianos e de seus subprodutos.

As avaliações toxicológicas e da patogenicidade são feitas através de uma série de testes, divididos em três fases distintas (BRASIL, 2006). :

A **Fase I** consiste em uma bateria de testes de curta duração, cujo organismo-teste (mamífero) recebe uma dose máxima única do agente de controle com o objetivo de se obter a máxima chance do agente de controle causar toxicidade, infectividade e patogenicidade. Se nenhum efeito adverso for observado nesta Fase, não há necessidade de se realizar nenhum dos testes das Fases II e III

A **Fase II** foi elaborada para avaliação de uma situação particular, em que se observa toxicidade ou infectividade na Fase I, sem evidências de patogenicidade. Se for observada a patogenicidade na Fase I, devem-se realizar os estudos da Fase III. E nesta, deverão ser feitos estudos adicionais a fim de avaliarem efeito de toxicidade conforme protocolos apropriados.

## 2.7 PROTOCOLOS INTERNACIONAIS DE BIOSSEGURANÇA

Uma das principais apreensões internacionais é a normalização do emprego da engenharia genética na manipulação de plantas GM ou de OGM. Deste modo, as principais organizações mundiais como a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a agricultura e a Alimentação (FAO – “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*”) estão voltadas para a elaboração de protocolos que assegurem a biossegurança dos transgênicos, tanto para a saúde humana quanto para os impactos ambientais.

Em 1996, na Conferência das Partes, na Argentina, foi aprovado o uso das Normas Técnicas de Biossegurança do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) (FONTES, 1998). Em 2002 no Canadá, 176 países assinaram o Protocolo de

Cartagena ou Protocolo Internacional de Biossegurança, que atuaria com mais vigor no controle de Organismos Geneticamente Modificados (OGM).

### 3 HIPÓTESES

Se ingeridas, as toxinas do *Bacillus thuringiensis* podem ser também citotóxicas para mamíferos, caso não sejam destruídas ou inativadas no estômago. Se administradas por via intraperitoneal, tais toxinas podem alterar o padrão de proliferação celular da medula óssea de camundongos, sendo, nestes casos, genotóxicas para mamíferos.

### 4 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar possíveis efeitos hematotóxicos dos esporos-cristais Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, em doses simples e combinadas, em camundongos.
- Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade desses esporos-cristais, em doses simples e combinadas, sobre a medula óssea de camundongos.
- Verificar a relação de dose-efeito, diferenças entre os tratamentos, vias de administração e tempo de exposição aos esporos-cristais.

## 5 CAPÍTULO I – Avaliação da hematotoxicidade e da genotoxicidade de esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis kurstaki* administrados por via oral e via intraperitoneal em camundongos Swiss

### 5.1 INTRODUÇÃO

O setor agrônômico tem se favorecido da tecnologia do ácido desoxirribonucléico recombinante (ADN-recombinante), dentre outros fatores, para a modificação de microrganismos e plantas (OECD, 1986; BOBROWSKI *et al.*, 2003) em prol da redução de aditivos químicos no ambiente (BRAVO *et al.*, 2007; KLETER *et al.*, 2007). O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é um agente de controle microbiano que tem ganhado respaldo de técnicas moleculares em benefício ao melhoramento genético de diversas culturas, como da soja, do milho e do algodão (De MAAGD *et al.*, 1999a, OECD, 2007).

Desde a década 60, esse entomopatógeno é um importante aliado ao combate de insetos-praga da agricultura, contra mosquitos vetores de doenças humanas e no controle biológico através da sua utilização como bioinseticida foliar (FEDERICI, 2005; PIGOTT; ELLAR, 2007), e mais recentemente, pela inserção de seus genes modificados em plantas-Bt transgênicas (FISCHHOFF *et al.*, 1987; BRAVO *et al.*, 2007). É considerado um biopesticida altamente específico, não-contaminante e, inócuo a humanos e aos demais vertebrados (BRAVO *et al.*, 2005).

O Bt caracteriza-se pela produção de uma ou mais proteínas, denominadas de  $\delta$ -endotoxinas, rearranjadas em forma de cristal (Cry) (De MAAGD *et al.*, 2001; BRAVO *et al.*, 2007), cuja atividade é tóxica para larvas de insetos de diversas Ordens e para determinados nematóides (PRAÇA *et al.*, 2004, KOTZE *et al.*, 2005). Os cristais podem ser sintetizados por diferentes variedades de Bt (JAOUA *et al.*, 1996) e uma mesma estirpe pode produzir uma ou mais toxina Cry (BRAVO *et al.*, 2005). As toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa em estudo são produzidas pelo *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e têm especificidade por insetos da Ordem Lepidoptera (MONNERAT *et al.*, 1999; FEDERICI, 2005).

As Cry exercem sua toxicidade quando ativada em pH alcalino do trato digestório de larvas susceptíveis (HÖFTE; WHITELEY, 1989, GÓMEZ *et al.*, 2007). A toxina é ingerida pelas larvas (LI *et al.*, 2001) e, de modo geral, ao atingir o intestino médio, sofre ação proteolítica (TOJO; AIZAWA, 1983; ARANDA *et al.*, 1996; ZHONG *et al.*, 2000) convertendo-se para a sua forma tóxica, o que ocasiona inicialmente paralisia intestinal,

seguida de paralisia total, levando-as ao óbito (ARONSON *et al.*, 1986; MONNERAT; BRAVO, 2000).

Além do extraordinário mecanismo de ação, o espectro tóxico também se deve ao tipo e à proporção de cada variedade de Cry nas diferentes estirpes isoladas (CRICKMORE *et al.*, 2006, PIGOTT; ELLAR, 2007). Em consequência, os genes (*cry*) responsáveis pela codificação das Cry têm sido amplamente clonados e expressos em cultivares-Bt transgênicos (De MAAGD *et al.*, 1999a; ESTRUCH *et al.*, 1997), com a finalidade de retrair a utilização de pesticidas sintéticos e ascender à economia global (De MAAGD *et al.*, 1999a; HUANG *et al.*, 2003).

A preocupação com a introdução de plantas-Bt em áreas de cultivo extensivo, por outro lado (De MAAGD *et al.*, 1999a), tem provocado uma apreensão em nível mundial de entidades estatais e não-governamentais sobre os efeitos adversos nos ecossistemas e, portanto, nos organismos não-alvo (O'CALLAGHAN *et al.*, 2004; OECD, 2007). Deste modo, testes de biossegurança são necessários para gerenciar riscos eminentes (FEDERICI, 2005, OECD, 2007). O objetivo deste trabalho foi então, avaliar em camundongos a toxicidade e genotoxicidade de quatro variedades de toxinas Cry associadas a seus esporos, em duas vias de administração.

## 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar, a partir da análise do hemograma, possíveis efeitos adversos sobre a hematopoiese, em camundongos não-isogênicos, em decorrência dos tratamentos com os esporos-cristais Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, provenientes de estirpes do *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.
- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade dos esporos-cristais em questão, verificando dose-efeito e comparando vias de administração, oral e intraperitoneal.

## 5.3 MATERIAL E MÉTODO

### 5.3.1 Obtenção das toxinas esporo-cristal

Os esporos-cristais Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa provenientes do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* são selecionados e modificados geneticamente para expressar cada qual uma das proteínas Cry. Integram o Banco de GERMOPLASMA da EMBRAPA – CENARGEN e foram cedidos na forma de liofilizados.

### 5.3.2 Camundongos

O projeto de registro UnBDOC nº 32942/2009 (em anexo) foi deferido pelo Comitê de Ética do Uso Animal – CEUA – da Universidade de Brasília – UnB, Brasil e os testes *in vivo* atenderam às exigências propostas. Os camundongos selecionados para o estudo são da linhagem não-isogênica Swiss e foram disponibilizados pelo biotério da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo - USP, campus Ribeirão Preto, SP, da Bioagri Laboratórios Ltda. -BIOAGRI, DF ou do Biotério Central da Universidade de Brasília - UnB, campus Darci Ribeiro, DF. Até a sua utilização experimental, eles foram aclimatados no biotério do Laboratório de Genética e de Nanobiotecnologia, - UnB, e acondicionados em caixas contendo maravalha autoclavada, alimentados com ração *ad libitum* e água filtrada. O período de climatização dos animais foi de pelo menos sete dias e, em cada teste foi utilizado um número amostral (n) de seis camundongos com idade aproximada de três meses, sendo 50% do sexo masculino e 50% do sexo feminino, os quais receberam numeração individual no decorrer dos experimentos.

### 5.3.3 Vias de administração

Os esporos-cristais foram ressuspensos em água destilada, temperatura de 37° C, agitados por 10 minutos e administrados pelas vias intraperitoneal (i.p.) e oral (p.o). A dose máxima foi 10 vezes maior que a dose mínima e a dose média equivale aproximadamente à metade da dose máxima. A dose mínima dos tratamentos equivale à dose do controle positivo com ciclofosfamida, e esta, já é conhecida por induzir citotoxicidade e genotoxicidade em camundongos na dose de 27 mg/Kg.

Portanto:

Dose mínima: 27 mg/Kg peso

Dose intermediária: 136 mg/Kg peso

Dose máxima: 270 mg/Kg peso

#### 5.3.3.1 Via intraperitoneal

Os camundongos foram tratados com uma única injeção via intraperitoneal (i.p.) de esporos-cristais Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa nas doses de 27 mg/Kg peso, 136 mg/Kg peso e 270 mg/Kg peso. Os grupos controle negativo (C) e positivo (CP) receberam, respectivamente, 27 mg/Kg peso de água destilada (veículo) e uma dose de 27 mg/Kg peso de ciclofosfamida, respectivamente. Decorridas 24 horas do tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para a realização dos procedimentos experimentais descritos nos itens 3.4 e 3.5.

#### 5.3.3.1 Via oral

Os esporos-cristais Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa foram administrados por gavagem (dose única) nas doses mínima, intermediária e máxima. O esporo-cristal Cry1Ac foi administrado apenas na dose mínima de 27 mg/Kg peso. Os controles negativo (C) e positivo (CP) receberam, respectivamente, água filtrada ou uma dose de 27 mg/Kg peso de ciclofosfamida. Decorridas 24 horas do tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para a realização dos procedimentos experimentais descritos nos itens 3.4 e 3.5.

#### 5.3.4 Coleta de sangue periférico e hemograma

Uma alíquota de 400  $\mu$ L de sangue periférico foi coletada por punção cardíaca, utilizando-se seringas descartáveis de 1 mL, enxaguadas com EDTA. Cerca de 10  $\mu$ L de sangue foi utilizado para a confecção de esfregaço sanguíneo; o restante foi transferido para tubos tipo *Eppendorf* contendo 40  $\mu$ L de EDTA 20%, para ser processado em um hematocítmetro veterinário automático, calibrado para camundongos, marca Sysmex pocH-100iV Diff.

Após a confecção do esfregaço sanguíneo, as lâminas foram deixadas para secar à temperatura ambiente por 12 horas, fixadas em metanol por 5 minutos e coradas com 300 µL de solução estoque de Wright-Giemsa por 3 minutos e 30 segundos (1,5 g de Wright, 0,17 g de Giemsa, 500 mL de metanol e 15 mL de glicerina). Imediatamente após, cada lâmina foi totalmente coberta pela solução tampão de fosfato A e B (16,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 8,16 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> diluídos em 1 L de água destilada), pH 6,8, na proporção de 1:1, por 4 minutos. A seguir, foram lavadas em água corrente e secadas naturalmente. As análises manuais de Leucócitos foram realizadas quando necessárias.

Foram analisados os seguintes parâmetros do hemograma: Eritrócitos, Hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT) e índices hematimétricos (volume corpuscular médio ou VCM, hemoglobina corpuscular média ou HCM, concentração hemoglobínica corpuscular média ou CHCM, e amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos Eritrócitos ou RDW – do inglês *Red Cell Distribution Width*), Leucócitos totais, Linfócitos, Neutrófilos + Monócitos, Eosinófilos, Plaquetas e índices plaquetários (volume plaquetário médio ou VPM; percentagem de Plaquetas gigantes ou P-LCR e amplitude ou variação da distribuição do tamanho das Plaquetas ou PDW – do inglês *Platelet Distribution Width*).

### 5.3.5 Obtenção de medula óssea femoral

A coleta de medula óssea seguiu protocolo de Schmid (1975) com adaptações. Os fêmures foram extraídos com auxílio de material cirúrgico e as suas epífises foram cortadas a fim de expor o canal medular. A medula óssea foi coletada com auxílio de uma agulha acoplada em seringa descartável de 1 mL contendo soro fetal bovino – SFB, em temperatura ambiente. O material foi acondicionado em tubos plásticos de 10 mL e centrifugado a uma velocidade de 5000 x g. Do sobrenadante, reservou-se uma alíquota de 50 µL que foi homogeneizada com o sedimento precipitado. Deste homogeneizado, cerca de 10 µL foram utilizados para a confecção de lâminas de vidro próprias para análises em microscópio de luz.

As lâminas confeccionadas secaram em temperatura ambiente por um período de 24 horas e, posteriormente, foram fixadas em metanol por cinco minutos. Para a observação em microscopia, elas foram coradas com solução estoque de Giemsa (1 g de Giemsa, 54 mL de glicerol e 4 mL de metanol) na proporção de 1 mL para 30 mL de tampão fosfato pH 6,8 A e B, 1:1, (16,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 8,16 g DE KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> diluídos em 1 L de água destilada) por nove minutos. Foram então enxaguadas em água corrente filtrada e secadas naturalmente.

### 5.3.6 Teste do micronúcleo

As análises foram feitas em microscopia de luz com aumento de 1000 x, em microscópio Zeiss Axioskop 2. Para a contagem eritrocitária foi utilizado um contador manual. O potencial genotóxico das toxinas Cry foi avaliado pela quantificação de micronúcleos (MN) em Eritrócitos policromáticos (EPC) e em Eritrócitos normocromáticos (ENC) de um total de 4000 células, sendo 2000 EPC e 2000 ENC. A citotoxicidade das Cry foi avaliada pela razão percentual de Eritrócitos policromáticos (%EPC) por normocromáticos (%ENC), isto é, quando atingidas 2000 células por qualquer uma das duas populações, registrou-se, portanto, o valor da sua correspondente. Este percentual foi calculado a partir da fórmula descrita a seguir:

$$\%EPC = [EPC / (EPC + ENC)] \times 100$$

### 5.3.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o software aplicativo SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 15.0. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As variáveis contínuas foram testadas para distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Possíveis diferenças entre os grupos analisados foram investigadas pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis (quando os dados não estavam normalmente distribuídos). Para resultados significativos com ANOVA, o teste Bonferroni's (post-hoc) foi escolhido para realizar as comparações 2 a 2 entre os tratamentos. Para os resultados significativos com o teste de Kruskal-Wallis, foi usado o teste de Mann-Whitney para verificar diferenças entre os tratamentos (comparações 2 a 2). Os valores de p com significado estatístico ( $p < 0,05$ ) só foram considerados quando também assumiram sentido biológico e, para tanto, atenderam aos seguintes critérios:

- C e CP comparados com todos os grupos da **mesma via** de administração, inclusive, entre si.
- **Em vias diferentes**, cada controle comparado apenas entre si.
- Quando eram tratamentos com as mesmas toxinas, na mesma via, porém, em **doses diferentes**.

- Quando se tratavam de tratamentos com **toxinas diferentes**, na mesma dose e mesma via.
- Quando se tinham os tratamentos com as mesmas toxinas, na mesma dose, porém, em **vias diferentes**.

## 5.4 RESULTADOS

Cerca de 28,57% dos animais que receberam a dose de 270 mg/Kg peso de esporos-cristais Cry1Aa e Cry2Aa via i.p morreram antes do período de 24 horas. Este percentual aumentou para 42,85% quando se tratou com Cry1Ab. A Cry1Ac teve um comportamento anômalo quando comparada com as toxinas anteriores e, neste caso, a dose intermediária de 136 mg/Kg peso foi letal para 100% dos indivíduos. Portanto, a dose máxima considerada foi a de 27 mg/Kg peso, sem registro de óbito. Na via p.o., ao contrário, todos os animais sobreviveram, inclusive na dose máxima de 270 mg/Kg peso, testada para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa.

### 5.4.1 Eritrograma

#### 5.4.1.1 Via oral

Em relação ao controle negativo, diferenças significativas no eritrograma foram detectadas pelo teste de ANOVA para eritrócitos ( $p=0,040$ ), HCM ( $p=0,000$ ), CHCM ( $p=0,006$ ), VCM ( $p=0,000$ ) e RDW ( $p=0,000$ ). Nas comparações 2-a-2, nenhuma diferença significativa foi detectada pelo teste de Bonferroni para os valores de Eritrócitos. Para HCM, redução significativa apareceu após os tratamentos com Cry1Aa 270 mg/Kg ( $p=0,023$ ), Cry1Ab 136 ( $p=0,001$ ), Cry2Aa 27 mg/Kg ( $p=0,001$ ) e Cry2Aa 136 mg/Kg ( $p=0,029$ ), enquanto para CHCM, aumento significativo foi observado após o tratamento com Cry1Aa 27 mg/Kg ( $p=0,031$ ). Todos os tratamentos com Cry promoveram redução significativa de VCM em relação ao controle negativo em um nível de  $p<0,001$ . Exceto para Cry1Ab 136 e 270 mg/Kg e Cry1Ac 27 mg/Kg, os demais tratamentos também promoveram reduções significativas nos valores de RDW ( $p=0,000$  para Cry1Aa 27 e 136 mg/Kg;  $p=0,009$  para Cry1Aa 270 mg/Kg;  $p=0,008$  para Cry1Ab 27 mg/Kg;  $p=0,001$  para Cry2Aa 27 mg/Kg;  $p=0,015$  para Cry2Aa 136 mg/Kg e  $p=0,033$  para Cry2Aa 270 mg/Kg).

Resultados semelhantes de redução significativa de HCM também foram mostrados nas comparações com o controle positivo ( $p=0,019$  para Cry1Aa 270 mg/Kg;  $p=0,001$  para

Cry1Ab 136 mg/Kg e Cry2Aa 27 mg/Kg; e  $p= 0,023$  para Cry2Aa 136 mg/Kg), o mesmo acontecendo com os valores de VCM ( $p=0,001$  para Cry1Ab e Cry1Ac 27 mg/Kg;  $p=0,000$  para os demais tratamentos com Cry). Já para RDW, apenas os tratamentos com Cry1Aa 27 e 136 mg/Kg ( $p=0,020$  para ambos) promoveram reduções significativas em relação ao controle positivo.

Quanto à dose-efeito, nenhuma diferença significativa foi observada no eritrograma. Entretanto, entre toxinas, diferenças significativas foram observadas para os valores de VCM e RDW. Após tratamento com Cry2Aa 27 mg/Kg os valores de VCM foram significativamente menores do que aqueles obtidos com os tratamentos com Cry1Ab 27 mg/Kg ( $p=0,024$ ) e Cry1Ac 27 mg/Kg ( $p=0,030$ ). Para RDW, o tratamento com Cry1Aa 27mg/Kg apresentou valores significativamente menores em relação a Cry1Ac 27 mg/Kg ( $p=0,009$ ), o mesmo acontecendo com Cry1Aa 136 mg/Kg em relação a Cry1Ab 136 mg/Kg ( $p=0,044$ ) (Tabela 1).

#### 5.4.1.2 Via i.p.

Redução significativa nos valores de CHCM foi observada após tratamento com Cry1Ab 27 mg/Kg ( $p= 0,020$ ) em relação ao controle negativo, e após tratamento com Cry1Ab 27 ( $p= 0,000$ ), 136 ( $p= 0,001$ ) e 270 ( $p= 0,029$ ) mg/Kg e Cry2Aa 270 mg/Kg ( $p= 0,001$ ) em relação ao controle positivo. Os tratamentos com Cry1Ab 27 mg/Kg ( $p=0,020$ ) e 136 mg/Kg ( $p=0,004$ ) também provocaram aumento significativo nos valores de VCM, porém somente em relação ao controle positivo.

Relação de dose efeito foi observada apenas para Cry1Ab, onde a dose de 270 mg/Kg reduziu significativamente os valores de CHCM em relação à dose de 136 mg/Kg ( $p=0,002$ ). Entre toxinas, os valores de CHCM foram significativamente maiores para Cry1Aa 27 e 136 mg/Kg em relação a Cry1Ab 27 ( $p= 0,000$ ) e 136 mg/Kg ( $p= 0,000$ ). Cry1Aa ainda apresentou valores de VCM significativamente menores que Cry1Ab ( $p=0,001$ ) e Cry2Aa ( $p=0,022$ ) na dose de 27 mg/Kg, o mesmo ocorrendo na dose de 136 mg/Kg em relação a Cry1Ab ( $p=0,000$ ), e na dose de 270 mg/Kg em relação a Cry2Aa ( $p=0,020$ ) (Tabela 1).

#### 5.4.1.3 Via oral x Via i.p.

Quando comparadas as duas vias de administração, diferenças significativas foram observadas para Eritrócitos, após tratamento com ciclofosfamida (CP) e com Cry2Aa 27mg/Kg; HCT, após tratamento com Cry1Ab 136 mg/Kg; HCM, após tratamento com Cry2Aa 27 mg/Kg; CHCM, após tratamento com Cry1Ab 27, 136 e 270 mg/Kg e Cry2Aa 270 mg/Kg; VCM, após tratamento com Cry1Ab 27, 136 e 270 mg/Kg e Cry2Aa 27, 136 e 270 mg/Kg; e RDW, após tratamento com Cry1Ab e Cry2Aa a 27 mg/Kg (Tabela 1). Os valores de Eritrócitos foram significativamente maiores na via i.p. em relação à via oral, verificados para CP ( $p= 0,015$ ) e Cry2Aa a 27 mg/Kg ( $p= 0,009$ ). Para HCT, os valores também foram significativamente maiores na via i.p. do que na via oral após os tratamentos com Cry1Ab 136 mg/Kg ( $p= 0,000$ ), o mesmo ocorrendo com HCM após os tratamentos com Cry2Aa 27 mg/Kg ( $p= 0,002$ ). Já para CHCM, os valores da via oral foram significativamente maiores do que os observados na via i.p. após tratamento com Cry1Ab 27 ( $p= 0,000$ ), 136 ( $p= 0,016$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,000$ ) e Cry2Aa 270 mg/Kg ( $p= 0,000$ ), enquanto para VCM, os valores foram significativamente menores para a via oral após os mesmos tratamentos, inclusive para os tratamentos com Cry2Aa nas três administrações ( $p= 0,001$  para Cry1Ab 270 mg/Kg;  $p= 0,000$  para os tratamentos Cry1Ab 27 e 136 mg/Kg, e Cry2Aa 27 e 270 mg/Kg;  $p= 0,002$  para Cry2Aa 136 mg/Kg). Quanto ao RDW, diferenças significativas foram observadas após o tratamento com Cry1Ab ( $p= 0,006$ ) e Cry2Aa ( $p= 0,023$ ) 27 mg/Kg, cujos valores foram menores na via oral (Tabela 1).

#### 5.4.2 Leucograma

##### 5.4.2.1 Via oral

Em relação ao controle negativo, os tratamentos com Cry1Ab 27 mg/Kg e Cry1Ac 27 mg/Kg promoveram, respectivamente, aumento significativo de Linfócitos ( $p= 0,041$ ) e de Leucócitos totais ( $p=0,026$ ). Em relação à dose-efeito, diferenças significativas apareceram para Linfócitos após o tratamento com Cry1Ab, cujos valores diminuíram significativamente nas concentrações de 136 mg/Kg ( $p= 0,005$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,016$ ), quando comparados à dose de 27 mg/Kg. Também foram observadas diferenças significativas entre toxinas nas doses de 27 e 136 mg/Kg. Na dose de 27 mg/Kg os valores de Linfócitos apresentaram-se significativamente reduzidos após o tratamento com Cry2Aa, quando comparados aos

tratamentos com Cry1Aa ( $p= 0,037$ ), Cry1Ab ( $p=0,005$ ) e Cry1Ac ( $p= 0,016$ ), o mesmo ocorrendo com Leucócitos totais em relação ao tratamento com Cry1Ab ( $p= 0,016$ ). Resultados semelhantes foram observados para a dose 136 mg/Kg, onde os valores de Linfócitos apresentaram-se significativamente diminuídos após a administração Cry1Ab em relação a Cry1Aa ( $p= 0,030$ ) (Tabela 2).

#### 5.4.2.2 Via i.p.

Em relação ao controle negativo, redução significativa de Linfócitos foi observada após os tratamentos com Cry1Aa 270 mg/Kg ( $p=0,015$ ), Cry1Ab 136 ( $p= 0,026$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,009$ ) e Cry2Aa 136 ( $p=0,009$ ) e 270 mg/Kg ( $p=0,041$ ). Cry1Ab 270 mg/Kg ainda promoveu aumento significativo de Neutrófilos+Monócitos ( $p= 0,041$ ). Aumento significativo de Eosinófilos foi observado para os tratamentos com Cry1Aa a 136 mg/Kg ( $p= 0,015$ ) e Cry1Ab a 27 mg/Kg ( $p= 0,015$ ).

Nas comparações com o controle positivo, os Linfócitos apresentaram-se significativamente diminuídos após os tratamentos com Cry1Aa 136 ( $p= 0,004$ ) e 270 mg/Kg ( $p=0,002$ ), Cry1Ab 27 ( $p=0,015$ ), 136 ( $p=0,002$ ) e 270 mg/Kg ( $p=0,002$ ), Cry1Ac 27 mg/Kg ( $p=0,004$ ), Cry2Aa 27 ( $p= 0,004$ ), 136 ( $p=0,002$ ) e 270 mg/Kg ( $p=0,015$ ). A maioria dos tratamentos também apresentou aumento significativo de Neutrófilos+Monócitos em relação ao controle positivo ( $p= 0,015$  para Cry1Aa 27 mg/Kg,  $p= 0,002$  para Cry1Aa 270 mg/Kg, Cry1Ab 27, 136 e 270 mg/Kg, Cry1Ac 27 mg/Kg, Cry2Aa 27, 136 e 270 mg/Kg). Para Eosinófilos, aumento significativo foi verificado após os tratamentos com Cry1Aa 136 mg/Kg ( $p= 0,004$ ) e Cry1Ab 27 mg/Kg ( $p= 0,004$ ), enquanto redução significativa foi verificada com Cry2Aa 27 mg/Kg ( $p= 0,009$ ).

Considerando-se dose-efeito, o número de Linfócitos apresentou-se significativamente reduzido após o tratamento com Cry1Aa na dose de 270 mg/Kg em relação à dose de 27 mg/Kg ( $p=0,041$ ), enquanto Neutrófilos+Monócitos mostraram-se significativamente aumentados na dose de 270 mg/Kg em relação à dose de 136 mg/Kg ( $p=0,002$ ). Já para o tratamento com Cry1Ab o aumento da dose de 27 mg/Kg para 136 mg/Kg provocou redução significativa na população de Neutrófilos+Monócitos ( $p=0,004$ ). Para Eosinófilos, aumento significativo foi observado após tratamento com Cry2Aa 270 mg/Kg em relação à dose de 27 mg/Kg ( $p= 0,041$ ).

Também foram observadas diferenças entre toxinas para as populações de Neutrófilos+Monócitos e Eosinófilos nas concentrações de 27 e 136 mg/Kg. Na dose de 27

mg/Kg, foi notado aumento significativo de Neutrófilos+Monócitos após os tratamentos com Cry1Ab ( $p= 0,026$ ) e Cry1Ac ( $p= 0,015$ ) em relação à Cry1Aa. Efeito semelhante ocorreu com Cry1Ab em contraste com Cry2Aa ( $p= 0,004$ ). Ainda na dose de 27 mg/Kg o tratamento com Cry2Aa também apresentou redução significativa de Eosinófilos em relação aos tratamentos com Cry1Aa ( $p= 0,015$ ), Cry1Ab ( $p= 0,002$ ) e Cry1Ac ( $p= 0,026$ ). Na dose de 136 mg/Kg, os valores de Neutrófilos+Monócitos foram significativamente mais elevados quando comparados os tratamentos Cry1Ab e Cry2Aa ( $p= 0,002$  para ambos) com o tratamento Cry1Aa. Nesta concentração de 136 mg/Kg e de forma semelhante à concentração de 27 mg/Kg, a população de Eosinófilos apresentou redução significativa após o tratamento com Cry2Aa quando comparada aos tratamentos com Cry1Aa ( $p= 0,004$ ) e Cry1Ab ( $p= 0,026$ ) (Tabela 2).

#### 5.4.2.3 Via oral x Via i.p.

Os valores de Leucócitos totais apresentaram-se significativamente maiores na via oral do que na via i.p. para os tratamentos com Cry1Aa 136 mg/Kg ( $p= 0,004$ ). Resultados semelhantes foram observados para Linfócitos com os tratamentos com Cry1Aa 136 mg/Kg ( $p= 0,015$ ), Cry1Aa 270 mg/Kg ( $p= 0,004$ ), Cry1Ab 27 mg/Kg ( $p= 0,004$ ), Cry1Ab 270 mg/Kg ( $p= 0,009$ ) e Cry1Ac 27 mg/Kg ( $p= 0,015$ ). Neutrófilos + Monócitos apresentaram diferenças significativas entre os controles positivos das duas vias de administração ( $p= 0,002$ ), cujos valores reduziram após administração via i.p. Também foram observadas diferenças significativas nas comparações entre as duas vias para os tratamentos com Cry1Aa e Cry1Ab. No tratamento via oral com Cry1Aa 136 mg/Kg a população de Neutrófilos + Monócitos foi significativamente superior àquela observada com a mesma dose na via i.p ( $p= 0,002$ ). Já para o tratamento com Cry1Ab a 27 ( $p= 0,041$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,015$ ) a população destas células apresentou-se significativamente maior na via i.p., quando comparada na mesma dose na via oral. Os tratamentos via i.p. com Cry1Aa 27 e 136 mg/Kg ( $p= 0,015$  para ambos) promoveram aumento significativo de Eosinófilos, quando comparado aos mesmos tratamentos na via oral. Do mesmo modo, os tratamentos com Cry1Ab 27 ( $p= 0,002$ ), 136 ( $p= 0,041$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,041$ ) na via i.p. tiveram seus valores significativamente aumentados em comparação aos seus respectivos tratamentos na via oral (Tabela 2).

### 5.4.3 Plaquetograma

#### 5.4.3.1 Via oral

Em relação ao controle negativo, o tratamento com Cry1Aa 27 mg/Kg promoveu aumento significativo de Plaquetas ( $p=0,009$ ) e redução significativa nos valores de VPM ( $p=0,015$ ) e P-LCR ( $p=0,026$ ). Redução significativa do P-LCR ainda foi observada após o tratamento com Cry1Aa 136 mg/Kg ( $p=0,041$ ), o mesmo ocorrendo com PDW após o tratamento com Cry1Aa 270 mg/Kg ( $p=0,026$ ).

Em relação ao controle positivo, aumento significativo de Plaquetas ocorreu após os tratamentos com Cry1Aa 27 mg/Kg ( $p=0,002$ ), Cry1Aa 270 mg/Kg ( $p=0,041$ ), Cry1Ac 27 mg/Kg ( $p=0,041$ ) e Cry2Aa 27 mg/Kg ( $p=0,041$ ). Além disto, também foram observadas reduções significativas nos valores de VPM após o tratamento com Cry1Aa 27 mg/Kg ( $p=0,041$ ), e nos valores de PDW após os tratamentos com Cry1Aa 27 mg/Kg ( $p=0,041$ ), Cry1Aa 270 mg/Kg ( $p=0,004$ ) e Cry1Ab 27 mg/Kg ( $p=0,026$ ).

Relação de dose-efeito foi observada apenas para Cry1Aa, onde a dose de 136 mg/Kg apresentou número de plaquetas significativamente diminuídos em relação à dose de 27 mg/Kg ( $p=0,016$ ) e valores de PDW significativamente aumentados em relação à dose de 270 mg/Kg ( $p=0,012$ ).

Entre toxinas, na dose de 27 mg/Kg Cry1Aa apresentou número de plaquetas significativamente aumentado em relação a Cry1Ab ( $p=0,016$ ) e Cry1Ac ( $p=0,013$ ), valores de VPM significativamente reduzidos em relação a Cry1Ac ( $p=0,023$ ) e Cry2Aa ( $p=0,043$ ) e PDW significativamente menor que Cry1Ac ( $p=0,023$ ). Cry1Ac 27 mg/Kg ainda mostrou valores de PDW significativamente maiores do que Cry1Ab ( $p=0,023$ ). Na dose de 136 mg/Kg, Cry1Aa também apresentou valores de VPM significativamente diminuídos em a Cry2Aa ( $p=0,029$ ). Na dose de 270 mg/Kg, o número de plaquetas foi significativamente maior para Cry1Aa em relação a Cry2Aa ( $p=0,045$ ), e os valores de PDW foram significativamente menores para Cry1Aa em relação a Cry1Ab ( $p=0,033$ ).

#### 5.4.3.2 Via i.p.

Para VPM, os valores do controle negativo foram significativamente menores do que aqueles do controle positivo ( $p=0,026$ ) e de quase todos os demais tratamentos, com exceção de Cry1Aa 27 e 136 mg/Kg e Cry1Ab 270 mg/Kg ( $p=0,004$  para os tratamentos com Cry1Aa

270 mg/Kg, Cry1Ab 27 mg/Kg e Cry2Aa 27 mg/Kg;  $p= 0,002$  para os tratamentos com Cry1Ab 136 mg/Kg, Cry1Ac 27 mg/Kg e Cry2Aa 136 mg/Kg;  $p= 0,026$  para Cry2Aa 270 mg/Kg). Em relação ao controle positivo, somente os tratamentos Cry1Ab 27 mg/Kg ( $p= 0,030$ ) e Cry2Aa 270 mg/Kg ( $p= 0,002$ ) promoveram aumentos significativamente nos valores de VPM. Aumento significativo nos valores de PDW foi observado para Cry1Ab 136 ( $p= 0,034$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,045$ ) em relação ao controle negativo. Nenhuma diferença significativa foi verificada na relação de dose-efeito, mas entre toxinas o tratamento na dose 136 mg/Kg com Cry1Aa apresentou valores de VPM significativamente menores que o tratamento com Cry2Aa ( $p= 0,041$ ) (Tabela 3).

#### 5.4.3.3 Via oral x i.p.

Houve diferenças significativas entre as vias de administração para o controle negativo, o VPM e o P-LCR foram significativamente maiores na via oral em relação à via i.p. Nos tratamentos com as Cry, os valores de Plaquetas foram significativamente maiores na via oral para Cry1Aa na dose de 27 mg/Kg ( $p= 0,002$ ), que apresentou valores de VPM significativamente menores nesta mesma via, quando comparados à via i.p. ( $p= 0,041$ ). De forma semelhante, os valores de VCM para os tratamentos com Cry1Ab 27 mg/Kg ( $p= 0,017$ ) e Cry2Aa 136 mg/Kg ( $p= 0,009$ ) tais valores apresentaram-se significativamente menores na via oral. Resultado similar ocorreu para PDW após os tratamento com Cry1Aa 270 mg/Kg ( $p= 0,004$ ), Cry1Ab 27 ( $p= 0,004$ ), 136 e 270 mg/Kg ( $p= 0,010$  para ambos), Cry1Ac 27 mg/Kg ( $p= 0,002$ ), Cry2Aa 136 ( $p= 0,002$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,026$ ) (Tabela 3).

#### 5.4.4 Teste do micronúcleo

##### 5.4.4.1 Via oral

Em relação ao controle negativo, não foram observadas diferenças significativas para MN-ENC e MN-EPC. Porém, tanto o controle positivo ( $p= 0,004$ ) quanto os tratamentos com Cry1Aa 136 mg/Kg ( $p= 0,041$ ), Cry1Ab 27 ( $p= 0,009$ ) e 136 mg/Kg ( $p= 0,026$ ), Cry2Aa 27 mg/Kg ( $p= 0,009$ ) promoveram queda significativa no índice de proliferação celular (%EPC).

Em relação ao controle positivo, os tratamentos com Cry1Aa 27 ( $p= 0,009$ ) e 136 mg/Kg ( $p= 0,015$ ), Cry2Aa 136 ( $p= 0,015$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,004$ ) promoveram reduções significativas de MN-ENC, o mesmo acontecendo com MN-EPC para os tratamentos com

Cry2Aa 27 (p= 0,004) e 270 mg/Kg (p=0002). Aumento significativo da %EPC foi observado para os tratamentos com Cry1Aa (p= 0,015) e Cry1Ab (p= 0,009) na dose de 270 mg/Kg.

Quanto à relação de dose-efeito, o tratamento com Cry2Aa a 136 mg/Kg apresentou aumento significativo de MN-EPC em relação a dose de 270 mg/Kg (p=0,011), enquanto o tratamento com Cry1Ab a 270 mg/Kg apresentou percentuais de EPC significativamente maiores do que os observados para as doses de 27 e 136 mg/Kg (p= 0,025 para ambos).

Entre toxinas, na dose de 27 mg/Kg Cry1Aa apresentou valores de MN-ENC significativamente menores do que Cry1Ab (p=0,042) e Cry1Ac (p=0,014), enquanto Cry2Aa mostrou valores de MN-EPC significativamente menores do que Cry1Aa (p=0,007), Cry1Ab (p=0,005) e Cry1Ac (p=0,005). Cry2Aa ainda apresentou valores de MN-EPC significativamente menores do que Cry1Ab (p=0,046) na dose de 136 mg/Kg, e do que Cry1Aa (p=0,003) na dose de 270 mg/Kg (Tabela 4).

#### 5.4.4.2 Via i.p.

Em relação ao controle negativo, aumento significativo de MN-ENC foi observado após os tratamentos com ciclofosfamida (CP) e com as diferentes toxinas Cry (p= 0,002 para CP e para os tratamentos Cry1Aa 136 e 270 mg/Kg, Cry1Ab 27 e 270 mg/Kg, Cry2Aa 27 e 136 mg/Kg; p= 0,004 para os tratamentos Cry1Aa 27 mg/Kg, Cry1Ab 136 mg/Kg, Cry1Ac 27 mg/Kg, Cry2Aa 270 mg/Kg). O controle positivo e a maioria dos tratamentos também provocou aumento significativo de MN-EPC em relação ao controle negativo, com exceção de Cry1Aa 27 mg/Kg, e Cry2Aa 27 e 270 mg/Kg (p= 0,002 para CP e para os tratamentos Cry1Aa 136 e 270 mg/Kg, Cry1Ab 27 e 136 mg/Kg, p= 0,004 para os tratamentos Cry1Ac 27 mg/Kg e Cry2Aa 136 mg/Kg; p= 0,041 para Cry1Aa 136 mg/Kg e p= 0,015 para Cry1Ab 270 mg/Kg). Exceto pelo tratamento com Cry1Ab 27 mg/Kg, os demais tratamentos com as Cry igualmente promoveram redução significativa do índice de proliferação celular (p= 0,002 para Cry1Aa 136 mg/Kg; p= 0,001 para Cry1Ac 27 mg/Kg e p= 0,000 para os restantes dos tratamentos). Contudo, em relação ao controle positivo, com exceção do tratamento com Cry1Ab 136 mg/Kg os demais tratamentos apresentaram valores de MN-ENC significativamente menores (p= 0,026 para Cry1Ab 270 mg/Kg; p= 0,004 para Cry1Ac 27 mg/Kg; p= 0,002 para os demais tratamentos). Todos os tratamentos com Cry também promoveram reduções significativas de MN-EPC em comparação com o controle positivo (p= 0,026 para Cry1Ab 136 mg/Kg; p= 0,004 para Cry1Ab 270 mg/Kg; p= 0,002 para os restantes dos tratamentos), o mesmo sendo observado para %EPC para quase todos os tratamentos,

com exceção de Cry1Ab 27 mg/Kg ( $p= 0,004$  para Cry1Aa 136 mg/Kg;  $p= 0,032$  para Cry1Ab 136 mg/Kg;  $p= 0,021$  para Cry1Ac 27 mg/Kg;  $p= 0,000$  para os demais tratamentos).

Quanto à relação de dose-efeito não foram obtidas diferenças significativas entre os tratamentos. Ao contrário, entre toxinas foram verificadas diferenças significativas em MN-EPC. Na dose de 27 mg/Kg, o tratamento com Cry1Ab a 27 mg/Kg provocou aumento significativo nos valores de MN-EPC em relação aos tratamentos Cry1Aa ( $p= 0,009$ ), Cry1Ac e Cry2Aa ( $p= 0,041$  para ambos). Da mesma forma, na dose de 270 mg/Kg, o tratamento com Cry1Ab provocou aumento significativo nos valores de EPC em relação a Cry2Aa ( $p= 0,041$ ) (Tabela 4).

#### 5.4.4.3 Via oral x Via i.p

O controle negativo apresentou o índice de EPC significativamente maior na via i.p. em relação à oral. O controle positivo apresentou valores de MN-ENC, MN-EPC e a %EPC também significativamente maiores na via i.p. em relação à via oral ( $p= 0,002$  para todos os parâmetros). De forma semelhante, os tratamentos via i.p. com Cry1Aa 27 ( $p= 0,015$ ), 136 ( $p= 0,004$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,026$ ), Cry1Ab 27 e 270 mg/Kg ( $p= 0,026$  para ambos), Cry2Aa 27 ( $p= 0,009$ ), 136 ( $p= 0,002$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,004$ ) mostraram aumento significativo de MN-ENC em comparação aos seus correspondentes na via oral. Os tratamentos na via i.p., com exceção de Cry1Aa e Cry1Ab na dose de 27 mg/Kg, também elevaram significativamente o MN-EPC em relação à via oral ( $p= 0,041$  para os tratamentos Cry1Aa 136 mg/Kg e Cry1Ac 27 mg/Kg;  $p= 0,026$  para Cry1Aa e Cry2Aa a 270 mg/Kg;  $p= 0,004$  para Cry1Ab e 2Aa a 136 mg/Kg;  $p= 0,009$  para Cry1Ab 270 mg/Kg e Cry2Aa 27 mg/Kg; e  $p= 0,002$  para Cry2Aa 136 mg/Kg). Para %EPC, o tratamento na via i.p. com Cry1Ab a 27 mg/Kg elevou significativamente a frequência de EPC em relação à via oral ( $p= 0,009$ ). Por outro lado, tais valores diminuíram significativamente na via i.p quando comparados à oral após os tratamentos com Cry1Aa 270 mg/Kg ( $p= 0,015$ ), Cry1Ab 270 ( $p= 0,026$ ), Cry2Aa 136 ( $p= 0,015$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,004$ ) (Tabela 4).

**Tabela 1** – Resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Ac na concentração de 27 mg/Kg e Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente (*per os*, p.o.) ou com uma única aplicação intraperitoneal (i.p.) 24h antes da eutanásia. Camundongos controle receberam água filtrada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg.

<b>G</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Eritrócitos</b> (x 10 <sup>6</sup> /μL)	<b>HGB</b> (g/dL)	<b>HCT</b> (%)	<b>HCM</b> (pg)	<b>CHCM</b> (g/dL)	<b>VCM</b> (fL)	<b>RDW</b> (%)
1	Água destilada, p.o.	7,53 ± 0,28	11,9 ± 0,44	30,38 ± 1,02	15,83 ± 0,09	39,12 ± 0,41	40,40 ± 0,40	17,83 ± 0,41
2	CP 27 mg/Kg, p.o	7,60 ± 0,12	12,05 ± 0,26	30,57 ± 0,66	15,85 ± 0,16	39,45 ± 0,75	40,22 ± 0,46	16,80 ± 0,60
3	Cry1Aa 27 mg/Kg, p.o	8,17 ± 0,13	12,67 ± 0,20	30,68 ± 0,36	15,52 ± 0,20	41,28 ± 0,32*	37,60 ± 0,37**	14,48 ± 0,64**
4	Cry1Aa 136 mg/Kg, p.o.	7,95 ± 0,16	12,20 ± 0,37	29,88 ± 0,80	15,33 ± 0,22	40,80 ± 0,38	37,57 ± 0,32**	14,48 ± 0,23**
5	Cry1Aa 270 mg/Kg, p.o.	8,35 ± 0,20	12,40 ± 0,29	31,08 ± 0,71	14,85 ± 0,16*	39,88 ± 0,34	37,22 ± 0,12**	15,38 ± 0,21**
6	Cry1Ab 27 mg/Kg, p.o.	8,17 ± 0,22	12,55 ± 0,42	31,13 ± 0,89	15,35 ± 0,22	40,30 ± 0,38	38,12 ± 0,21**	15,35 ± 0,31**
7	Cry1Ab 136 mg/Kg, p.o.	7,69 ± 0,09	11,23 ± 0,25	28,55 ± 0,62	14,62 ± 0,21**	39,35 ± 0,26	37,12 ± 0,42**	16,65 ± 0,56
8	Cry1Ab 270 mg kg, p.o.	8,19 ± 0,16	12,63 ± 0,20	30,77 ± 0,53	15,45 ± 0,18	41,07 ± 0,33	37,60 ± 0,17**	15,70 ± 0,36
9	Cry1Ac 27 mg/Kg, p.o.	7,98 ± 0,12	12,25 ± 0,24	30,42 ± 0,56	15,33 ± 0,20	40,28 ± 0,56	38,08 ± 0,22**	16,93 ± 0,36
10	Cry2Aa 27 mg/Kg, p.o.	8,24 ± 0,18	12,02 ± 0,15	29,95 ± 0,53	14,62 ± 0,22**	40,15 ± 0,35	36,40 ± 0,36**	15,02 ± 0,52**
11	Cry2Aa 136 mg/Kg, p.o.	7,86 ± 0,23	11,68 ± 0,33	29,05 ± 0,77	14,87 ± 0,10*	40,22 ± 0,18* <sup>a</sup>	36,97 ± 0,31**	15,47 ± 0,30*
12	Cry2Aa 270 mg/Kg, p.o.	7,75 ± 0,27	11,82 ± 0,37	28,97 ± 0,89	15,27 ± 0,17	40,82 ± 0,42	37,42 ± 0,29**	15,62 ± 0,34*
<b>P-valores via oral</b>		0,040	0,053	0,188	0,000	0,006	0,000	0,000
13	Água destilada, i.p.	7,94 ± 0,14	12,32 ± 0,22	31,53 ± 0,63	15,35 ± 0,26	39,10 ± 0,31	39,25 ± 0,60	16,27 ± 0,44
14	CP 27 mg/Kg, i.p.	8,12 ± 0,12	12,63 ± 0,24	31,22 ± 0,43	15,57 ± 0,17	40,48 ± 0,22	38,42 ± 0,28	16,63 ± 0,30
15	Cry1Aa 27 mg/Kg, i.p.	7,81 ± 0,20	11,80 ± 0,30	29,30 ± 0,63	15,12 ± 0,18	40,27 ± 0,29	37,57 ± 0,46	15,80 ± 0,11
16	Cry1Aa 136 mg/Kg, i.p.	7,99 ± 0,29	12,25 ± 0,46	29,78 ± 1,22	15,35 ± 0,15	41,18 ± 0,52	37,23 ± 0,27	14,95 ± 0,20
17	Cry1Aa 270 mg/Kg, i.p.	7,44 ± 0,48	11,13 ± 0,80	28,20 ± 1,98	14,93 ± 0,25	39,45 ± 0,39	37,82 ± 0,64	16,93 ± 0,66
18	Cry1Ab 27 mg/Kg, i.p.	7,69 ± 0,18	11,70 ± 0,31	32,65 ± 0,68	15,22 ± 0,17	35,82 ± 0,46*	42,47 ± 0,63	18,60 ± 1,02
19	Cry1Ab 136 mg/Kg, i.p.	8,22 ± 0,31	12,80 ± 0,46	35,22 ± 0,98	15,58 ± 0,20	36,30 ± 0,42	42,95 ± 0,89	17,35 ± 0,53
20	Cry1Ab 270 mg/Kg, i.p.	8,05 ± 0,42	12,40 ± 0,59	33,27 ± 1,45	15,45 ± 0,20	37,30 ± 0,92	41,53 ± 1,22	17,30 ± 0,65
21	Cry1Ac 27 mg/Kg, i.p.	7,50 ± 0,50	11,87 ± 0,74	30,73 ± 1,70	15,87 ± 0,35	38,55 ± 0,69	41,15 ± 0,89	16,80 ± 0,61
22	Cry2Aa 27 mg/Kg, i.p.	7,29 ± 0,26	11,63 ± 0,35	30,22 ± 0,66	15,98 ± 0,22	38,47 ± 0,41	41,58 ± 0,66	18,00 ± 0,41

<b>23</b>	Cry2Aa 136 mg/Kg, i.p.	7,68 ± 0,24	12,08 ± 0,42	31,28 ± 1,08	15,72 ± 0,21	38,67 ± 1,01	40,75 ± 0,96	17,37 ± 0,67
<b>24</b>	Cry2Aa 270 mg/Kg, i.p.	7,44 ± 0,25	11,35 ± 0,37	31,05 ± 0,50	15,27 ± 0,26	36,52 ± 0,92	41,87 ± 0,87	18,23 ± 0,87
	<b>P-valores via i.p.</b>	0,355	0,343	0,004	0,056	0,000	0,000	0,003
	<b>P-valores</b>	0,087	0,157	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). G= grupo; 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 = fentolitros; pg = picograma. Para Eritrócitos, o valor de p foi gerado pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto para as demais variáveis, os valores de p foram gerados por ANOVA. Os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) e altamente significativas (p<0,01) detectadas pelo teste de Mann-Whitney nas comparações com os controles negativos.

**Tabela 2** – Resultados do leucograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporocristais de Bt Cry1Ac na concentração de 27 mg/Kg e Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente (*per os*, p.o.) ou com uma única aplicação intraperitoneal (i.p.) 24h antes da eutanásia. Camundongos controle receberam água filtrada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg.

G	Tratamento	Leucócitos totais (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Linfócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Neutrófilos + Monócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Eosinófilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)
1	Água destilada, p.o.	4,63 ± 0,74	3,35 ± 0,55	1,22 ± 0,20	0,07 ± 0,05
2	CP 27 mg/Kg, p.o.	5,37 ± 0,77	3,73 ± 0,53	1,58 ± 0,34	0,05 ± 0,03
3	Cry1Aa 27 mg/Kg, p.o.	5,88 ± 0,82	4,57 ± 0,70	1,32 ± 0,13	0,00 ± 0,00
4	Cry1Aa 136 mg/Kg, p.o.	5,83 ± 0,50	4,45 ± 0,44	1,32 ± 0,12	0,07 ± 0,05
5	Cry1Aa 270 mg/Kg, p.o.	5,47 ± 0,77	3,93 ± 0,77	1,47 ± 0,31	0,07 ± 0,03
6	Cry1Ab 27 mg/Kg, p.o.	6,82 ± 0,62	5,13 ± 0,33*	1,68 ± 0,33	0,00 ± 0,00
7	Cry1Ab 136 mg/Kg, p.o.	4,60 ± 0,49	2,60 ± 0,42	1,92 ± 0,45	0,08 ± 0,03
8	Cry1Ab 270 mg/Kg, p.o.	4,60 ± 0,47	3,53 ± 0,43	0,98 ± 0,10	0,08 ± 0,04
9	Cry1Ac 27 mg/Kg, p.o.	6,90 ± 0,89*	4,25 ± 0,45	2,52 ± 0,66	0,13 ± 0,99
10	Cry2Aa 27 mg/Kg, p.o.	4,38 ± 0,63	2,43 ± 0,35	1,90 ± 0,53	0,05 ± 0,02
11	Cry2Aa 136 mg/Kg, p.o.	4,68 ± 1,06	3,05 ± 0,91	1,50 ± 0,32	0,13 ± 0,06
12	Cry2Aa 270 mg/Kg, p.o.	5,03 ± 0,78	2,98 ± 0,28	2,02 ± 0,73	0,03 ± 0,02
<b>P-valores via oral</b>		0,246	0,015	0,700	0,378
13	Água destilada, i.p.	5,00 ± 1,33	3,83 ± 0,65	1,05 ± 0,89	0,12 ± 0,04
14	CP 27 mg/Kg, i.p.	5,05 ± 0,49	4,83 ± 0,49	0,10 ± 0,00	0,12 ± 0,02
15	Cry1Aa 27 mg/Kg, i.p.	4,05 ± 0,99	3,17 ± 0,68	0,62 ± 0,40	0,27 ± 0,08
16	Cry1Aa 136mg/Kg, i.p.	2,75 ± 0,57	2,15 ± 0,44	0,18 ± 0,03	0,42 ± 0,14*
17	Cry1Aa 270 mg/Kg, i.p.	3,32 ± 0,88	1,33 ± 0,37*	1,48 ± 0,48	0,50 ± 0,22
18	Cry1Ab 27 mg/Kg, i.p.	5,68 ± 0,89	2,45 ± 0,51	2,87 ± 0,38	0,37 ± 0,08*
19	Cry1Ab 136 mg/Kg, i.p.	3,42 ± 0,53	1,70 ± 0,36*	1,43 ± 0,19	0,28 ± 0,08
20	Cry1Ab 270 mg/Kg, i.p.	5,13 ± 0,97	1,63 ± 0,26**	2,82 ± 0,74*	0,68 ± 0,20
21	Cry1Ac 27 mg/Kg, i.p.	5,25 ± 0,86	2,47 ± 0,35	2,58 ± 0,63	0,20 ± 0,06
22	Cry2Aa 27 mg/Kg, i.p.	3,70 ± 0,61	2,42 ± 0,42	1,27 ± 0,22	0,02 ± 0,02
23	Cry2Aa 136 mg/Kg, i.p.	2,57 ± 0,34	1,42 ± 0,37**	1,08 ± 0,07	0,07 ± 0,03
24	Cry2Aa 270 mg/Kg, i.p.	3,25 ± 1,18	1,57 ± 0,73*	1,58 ± 0,64	0,10 ± 0,03
<b>P-valores via i.p.</b>		0,125	0,002	0,000	0,001
<b>P-valores</b>		0,006	0,000	0,000	0,000

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). G= grupo. Os valores de p foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) e altamente significativas (p<0,01) detectadas pelo teste de Mann-Whitney nas comparações com os controles negativos.

**Tabela 3** – Resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos tratados esporos-cristais de Bt Cry1Ac na concentração de 27 mg/Kg e Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente (*per os*, p.o.) ou com uma única aplicação intraperitoneal (i.p.) 24h antes da eutanásia. Camundongos controle receberam água filtrada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg.

Grupo	Tratamento	Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)	VPM (fl)	P-LCR (%)	PDW (fl)
1	Água destilada p.o.	1219,00 ± 56,64	6,93 ± 0,10	10,88 ± 0,81	6,95 ± 0,11
2	CP (27 mg/Kg, p.o.	978,67 ± 93,57	7,10 ± 0,30	11,23 ± 2,33	7,25 ± 0,24
3	Cry1Aa 27 mg/Kg, p.o.	1481,50 ± 54,69**	6,30 ± 0,15*	6,70 ± 1,12*	6,68 ± 0,07
4	Cry1Aa 136 mg/Kg, p.o.	1162,33 ± 93,89	6,67 ± 0,10	8,63 ± 1,04*	6,83 ± 0,05
5	Cry1Aa 270 mg/Kg, p.o.	1292,00 ± 74,24	6,75 ± 0,15	11,15 ± 1,68	6,53 ± 0,07*
6	Cry1Ab 27 mg/Kg, p.o.	1168,00 ± 73,22	6,62 ± 0,17	9,93 ± 1,10	6,63 ± 0,10
7	Cry1Ab 136 mg/Kg, p.o.	1076,00 ± 148,54	6,85 ± 0,22	10,73 ± 1,74	6,75 ± 0,16
8	Cry1Ab 270 mg/Kg, p.o.	1020,5 ± 113,38	7,05 ± 0,16	12,33 ± 1,35	6,87 ± 0,11
9	Cry1Ac 27 mg/Kg, p.o.	1224,67 ± 58,93	6,90 ± 0,09	9,63 ± 0,88	7,03 ± 0,10
10	Cry2Aa 27 mg/Kg, p.o.	1282,33 ± 110,10	6,90 ± 0,16	10,24 ± 0,87	6,92 ± 0,14
11	Cry2Aa 136 mg/Kg, p.o.	1146,83 ± 62,99	6,97 ± 0,09	11,13 ± 0,94	6,90 ± 0,07
12	Cry2Aa 270 mg/Kg, p.o.	1057,50 ± 65,31	7,00 ± 0,10	11,78 ± 0,42	6,80 ± 0,13
<b>P-valores via oral</b>		0,022	0,079	0,107	0,029
13	Água destilada, i.p.	1137,50 ± 95,72	6,58 ± 0,05	7,08 ± 0,65	7,00 ± 0,10
14	CP 27 mg/Kg, i.p.	1133,00 ± 69,15	6,90 ± 0,09*	9,67 ± 0,48	7,05 ± 0,11
15	Cry1Aa 27 mg/Kg, i.p.	1033,50 ± 102,86	6,98 ± 0,20	10,53 ± 1,53	7,05 ± 0,22
16	Cry1Aa 136 mg/Kg, i.p.	1102,17 ± 139,43	6,87 ± 0,17	9,67 ± 1,44	7,03 ± 0,12
17	Cry1Aa 270 mg/Kg, i.p.	1121,80 ± 189,46	7,04 ± 0,19**	10,76 ± 1,44	7,04 ± 0,14
18	Cry1Ab 27 mg/Kg, i.p.	939,29 ± 184,83	7,35 ± 0,18**	12,55 ± 1,29	7,62 ± 0,12
19	Cry1Ab 136 mg/Kg, i.p.	934,17 ± 121,30	7,32 ± 0,18**	12,32 ± 1,39	7,73 ± 0,07
20	Cry1Ab 270 mg/Kg, i.p.	928,00 ± 121,72	7,55 ± 0,25	13,03 ± 1,69	7,80 ± 0,23
21	Cry1Ac 27 mg/Kg, i.p.	1000,33 ± 90,73	7,27 ± 0,14**	11,23 ± 0,89	7,57 ± 0,08

22	Cry2Aa 27 mg/Kg, i.p.	1244,50 ± 79,6	7,07 ± 0,13**	10,25 ± 0,77	7,28 ± 0,20
23	Cry2Aa 136 mg/Kg, i.p.	1090,33 ± 84,66	7,37 ± 0,08**	11,75 ± 1,20	7,55 ± 0,12
24	Cry2Aa 270 mg/Kg, i.p.	1052,33 ± 120,83	7,20 ± 0,20*	10,85 ± 1,40	7,38 ± 0,16
<b>P-valores via i.p.</b>		0,478	0,003	0,066	0,000
<b>Valores-p</b>		0,037	0,000	0,044	0,000

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). VPM= volume plaquetário médio; P-LCR= porcentagem de Plaquetas gigantes (do inglês *platelet large cell ratio*) e PDW= amplitude ou variação da distribuição do tamanho das Plaquetas (do inglês *platelet distribution width*). Para PDW, os valores de p foram gerados por ANOVA, enquanto para as demais variáveis, os valores de p foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) e altamente significativas (p<0,01) detectadas pelos testes de Bonferroni (PDW) ou Mann-Whitney (demais variáveis) nas comparações com os controles negativos.

**Tabela 4** – Resultados do teste do micronúcleo na medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Ac na concentração de 27 mg/Kg e Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa nas concentrações de 27, 136 e 270 mg/Kg, administradas oralmente (*per os*, p.o.) ou com uma única aplicação intraperitoneal (i.p.) 24h antes da eutanásia. Camundongos controle receberam água filtrada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg.

Grupo	Tratamento	MN-ENC	Eritrócitos Policromáticos (EPC)	
			MN-EPC	Índice de proliferação celular (%EPC)
1	Água destilada, p.o.	2,00 ± 1,44	2,50 ± 1,43	52,61 ± 1,01
2	CP 27 mg/Kg, p.o.	2,17 ± 0,48	3,50 ± 0,62	45,97 ± 1,21**
3	Cry1Aa 27 mg/Kg, p.o.	0,33 ± 0,21	2,83 ± 0,48	49,34 ± 1,48
4	Cry1Aa 136 mg/Kg, p.o.	0,50 ± 0,22	2,33 ± 0,42	48,62 ± 1,41*
5	Cry1Aa 270 mg/Kg, p.o.	1,00 ± 0,37	3,67 ± 0,56	52,9 ± 1,57
6	Cry1Ab 27 mg/Kg, p.o.	1,67 ± 0,49	4,67 ± 0,88	45,92 ± 1,54**
7	Cry1Ab 136 mg/Kg, p.o.	1,50 ± 0,43	3,33 ± 0,33	47,78 ± 1,28*
8	Cry1Ab 270 mg/Kg, p.o.	1,00 ± 0,37	2,17 ± 0,95	52,91 ± 1,55
9	Cry1Ac 27 mg/Kg, p.o.	1,33 ± 0,21	1,33 ± 0,21	49,49 ± 2,14
10	Cry2Aa (27 mg/Kg, p.o.	1,00 ± 0,52	0,83 ± 0,31	47,06 ± 1,25**
11	Cry2Aa 136 mg/Kg, p.o.	0,50 ± 0,22	2,00 ± 0,45	47,93 ± 1,89
12	Cry2Aa 270 mg/Kg, p.o.	0,17 ± 0,17	0,50 ± 0,22	48,63 ± 1,39
<b>P-valores via oral</b>		0,026	0,001	0,013
13	Água destilada i.p.	0,17 ± 0,17	2,33 ± 0,42	70,13 ± 0,87
14	CP 27 mg/Kg, i.p.	14,33 ± 1,99**	26,83 ± 2,52**	66,56 ± 1,30
15	Cry1Aa 27 mg/Kg, i.p.	2,17 ± 0,54**	3,33 ± 0,92	41,69 ± 4,67**
16	Cry1Aa 136 mg/Kg, i.p.	3,67 ± 0,96**	5,17 ± 1,17*	49,32 ± 4,69**
17	Cry1Aa 270 mg/Kg, i.p.	4,20 ± 0,66**	7,00 ± 0,84**	39,68 ± 3,28**
18	Cry1Ab 27 mg/Kg, i.p.	3,57 ± 0,90**	8,71 ± 1,57**	56,63 ± 2,49
19	Cry1Ab 136 mg/Kg, i.p.	6,50 ± 3,20**	12,17 ± 4,13**	51,91 ± 2,00**
20	Cry1Ab 270 mg/Kg, i.p.	6,17 ± 2,68**	9,67 ± 2,72*	46,28 ± 2,02**
21	Cry1Ac 27 mg/Kg, i.p.	2,50 ± 0,56**	5,67 ± 0,56**	51,36 ± 1,52**
22	Cry2Aa 27 mg/Kg, i.p.	3,83 ± 0,48**	4,33 ± 1,02	42,66 ± 2,53**
23	Cry2Aa 136 mg/Kg, i.p.	4,67 ± 0,76**	5,50 ± 0,56**	37,39 ± 2,83**
24	Cry2Aa 270 mg/Kg, i.p.	2,33 ± 0,42**	5,00 ± 1,03	34,71 ± 2,68**
<b>P-valores via i.p.</b>		0,000	0,000	0,000
<b>Valores-p</b>		0,000	0,000	0,000

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). MN-ENC= micronúcleos em eritrócitos normocromáticos; MN-EPC= micronúcleos em eritrócitos policromáticos. Para %EPC, o valor de p foi gerado por ANOVA, enquanto para as demais variáveis, os valores de p foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) e altamente significativas ( $p < 0,01$ ) detectadas pelos testes de Bonferroni (%EPC) ou Mann-Whitney (demais variáveis) nas comparações com os controles negativos.

## 5.5 DISCUSSÃO

As proteínas Cry possuem um espectro definido de atividade inseticida, sendo cada uma delas específica para algumas espécies pertencentes a uma Ordem particular de insetos (De MAAGD *et al.*, 2001). O mecanismo de ação das Cry depende da afinidade por receptores específicos nos seus organismos alvos, e, portanto, a ausência de receptores conhecidos no intestino de vertebrados e a própria fisiologia do seu sistema digestório tem considerado as  $\delta$ -endotoxinas com desconsiderável toxicidade para humanos e demais mamíferos (BETZ *et al.*, 2000; OECD, 2007). Desta forma, os inseticidas à base de Bt têm ganhado respaldo, e há décadas vêm sendo utilizados no controle biológico de pragas agrícolas sem registro de óbito para humanos (OECD, 2007). Entretanto, com a entrada no mercado agrícola das plantas geneticamente modificadas, como milho-Bt, algodão-Bt, soja-Bt, arroz-Bt, batata-Bt entre muitos outros, além do uso do próprio *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas agrícolas (bioinseticida), aumentou muito a biodisponibilidade das toxinas Bt no ambiente (De MAAGD *et al.*, 1999a). Além da preocupação pelo aumento da biodisponibilidade das toxinas Cry no ambiente com introdução de plantas transgênicas, os dados obtidos até o momento sobre a biossegurança de organismos não-alvo são considerados insuficientes e questionáveis (BISHOP *et al.*, 1999; SÉRALINI *et al.*, 2007). Conseqüentemente, por questões de biossegurança, é necessário avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade dessas toxinas Bt para os organismos não-alvo, sob diferentes vias de administração e em diferentes ecossistemas.

De modo geral, para os testes de biossegurança no manejo de Bt são utilizados modelos animais. Entretanto, são escassas as literaturas que abordam a biossegurança das  $\delta$ -endotoxinas para organismos não-alvo. Alguns estudos revelaram que produtos comerciais de Bt apresentam-se seguros e que a mortalidade observada em testes com camundongos foi verificada para as doses extremamente altas e dependentes da via de administração (BETZ *et al.*, 2000; SIEGEL, 2001). As vias intranasal e intraperitoneal foram mais agressivas e quando diminuídas as doses, não houve letalidade. Estas observações corroboram nossos resultados iniciais que demonstraram letalidade apenas para a administração intraperitoneal. Nesta via, o esporo-cristal Cry1Ac foi mais tóxico que os demais, sendo letal para 100% dos indivíduos na dose intermediária. Para os demais esporos-cristais, os efeitos adversos variaram de acordo com a dose e o esporo-cristal em estudo.

A investigação do hemograma e do teste do micronúcleo em modelos animais tem sido utilizada por permitirem a avaliação de possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos em

decorrência da administração de um determinado xenobiótico (GRISOLIA *et al.*, 2002; ZIEMMAN *et al.*, 2010). Em mamíferos há ausência de receptores específicos conhecidos nas células intestinais e a fisiologia do próprio sistema digestório não permite a ativação das  $\delta$ -endotoxinas (BETZ *et al.*, 2000; OECD, 2007). Entretanto, os resultados do eritrograma da via oral indicaram interferência na eritropoiese após uma única administração de Cry, com redução significativa particularmente do HCM e do VCM em relação ao controle negativo. Além disto, a contagem normal de plaquetas em camundongos varia de  $900-1600 \times 10^3/\mu\text{L}$  (EVERDS, 2007) e, apesar do tratamento com Cry1Aa 27 mg/Kg não ter ultrapassado os valores de referência, promoveu redução significativa de CHCM e VCM, conjuntamente com aumento significativo de Plaquetas, redução significativa de VPM e P-LCR. Visto que as protoxinas ativam-se para a sua forma mais tóxica quando em pH alcalino (De MAAGD *et al.*, 1999b; BRAVO *et al.*, 2002; PIGOTT; ELLAR, 2007), nossos resultados sugerem a possibilidade das toxinas não terem sido completamente destruídas no estômago, tendo sua forma mais tóxica ativada pelo pH alcalino intestinal. Também sugerem a possibilidade da existência de receptores desconhecidos no intestino de vertebrados com afinidade por estas toxinas. Portanto, sua toxicidade não é desconsiderável para mamíferos (e provavelmente nem para humanos), como até agora tem sido relatado (revisado por BETZ *et al.*, 2000 e OECD, 2007). Os resultados do teste do micronúcleo da via oral corroboraram os efeitos citotóxicos de Cry1Aa 136 mg/Kg, Cry1Ab 27 e 136 mg/Kg e Cry2Aa 27 mg/Kg, visto que provocaram inibição significativa na proliferação celular da medula óssea. Um estudo sobre toxicidade e genotoxicidade das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A na espécie de peixe *Danio rerio* verificou que cada uma delas tem propriedades tóxicas e genotóxicas específicas, sugerindo que uma abordagem mais específica deve ser levada em conta nas avaliações toxicológicas (GRISOLIA *et al.*, 2009).

Em camundongos, a resposta inflamatória é frequentemente associada tanto com o aumento de Linfócitos quanto de Neutrófilos. Contudo, pequenas mudanças na quantidade de Neutrófilos podem ser biologicamente significativas e refletidas na contagem total de Leucócitos (EVERDS, 2007). Neste contexto, os resultados do leucograma da via oral indicaram resposta inflamatória após tratamento com Cry1Ab e Cry1Ac 27 mg/Kg. Visto que já foram demonstradas (1) alterações imunofenotípicas no intestino e em sítios periféricos de camundongos jovens e idosos após ingestão de milho Bt MON810, que codifica a forma ativa de Cry1Ab (FINAMORE *et al.*, 2008), e (2) a administração intragástrica de protoxina Cry1Ac induziu secreção de anticorpos específicos nas mucosas de camundongos

(VÁZQUEZ-PADRÓN *et al.*, 1999); nossos resultados também demonstraram atividade leucogênica para estes esporos-cristais.

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos. O conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico industrializado ou naturalmente presente no ambiente é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem (RIBEIRO, 2003). Foi reportado para a espécie de peixe *Danio rerio* que a proteína Cry1Aa aumentou significativamente a frequência de micronúcleos em Eritrócitos de sangue periférico, enquanto que as demais não apresentaram genotoxicidade (GRISOLIA *et al.*, 2009). Entretanto, as toxinas Cry avaliadas no presente estudo, apesar de mostrarem-se hematotóxicas e citotóxicas para a medula óssea, não apresentaram efeito genotóxico quando administradas por via oral, indicando assim possíveis diferenças de respostas entre classes diferentes de vertebrados.

Na via intraperitoneal, possivelmente mais severa em decorrência das toxinas estarem mais biodisponíveis do que na administração oral, os efeitos citotóxicos e genotóxicos dependeram do esporo-cristal em estudo e da dose. Quando ocorre depressão na medula óssea provocando queda no índice mitótico (inibição), muitas formas de eritrócitos normocromáticos que deveriam ser eliminados da medula óssea para o sangue circulante permanecem na medula. Caso seu precursor (eritoblasto) tenha sofrido dano cromossômico, é plausível, então, de se encontrar aumentos na frequência de Eritrócitos normocromáticos com micronúcleo na medula óssea (MacGREGOR, 1990). Neste contexto, apesar de nenhuma alteração significativa ter ocorrido no eritrograma, o aumento significativo de MN-ENC após os tratamentos com Cry pode indicar um efeito citotóxico para a linhagem eritróide. Além disto, quase todos os tratamentos promoveram aumento significativo de MN-EPC, bem como redução do índice de proliferação celular da medula óssea, corroborando a sugestão acima e indicando genotoxicidade.

Os processos ou substâncias que danificam as células-tronco hematopoiéticas ou o estroma medular de camundongos podem ocasionar diminuição na contagem de Leucócitos (EVERDS, 2007). Neste sentido, a redução significativa de Linfócitos observada após administração intraperitoneal de Cry1Aa 270 mg/Kg, Cry1Ab 136 e 270 mg/Kg e Cry2Aa 136 e 270 mg/Kg pode indicar toxicidade seletiva para Linfócitos ou danos às células-tronco hematopoiéticas. Além disto, as mutações ou falhas que diminuem a capacidade dos Leucócitos de saírem do sangue circulante podem resultar no aumento da contagem de Leucócitos na circulação periférica (EVERDS, 2007). Portanto, o aumento significativo de

Neutrófilos+Monócitos após o tratamento com Cry1Ab 270 mg/Kg pode estar mais relacionado a estes tipos de disfunções do que a um processo inflamatório.

Teoricamente, todo alimento pode conter alguma proteína com potencial para induzir uma reação alérgica. Há muitos exemplos, como as castanhas, crustáceos, peixes, ovos e soja (GIZZARELLI *et al.*, 2006). As sequências de aminoácidos das proteínas Cry não têm similaridades com as das proteínas já conhecidas por desencadear alergia alimentar em humanos (OECD, 2007). Atualmente, há um grande número de plantas transgênicas que produzem alimentos de consumo global. Por outro lado, existem poucos estudos sobre os seus potenciais alergênicos (GIZZARELLI *et al.*, 2006). Portanto, o cuidado ao se liberar estas plantas ou seus produtos para o consumo humano deve ser exercitado, especialmente porque foi demonstrado que a exposição dos trabalhadores rurais a sprays de Bt resultou na sensibilização alérgica da pele e na indução de anticorpos IgG e IgE (MORENO-FIERROS *et al.*, 2000). Nossos resultados da via intraperitoneal apontaram aumento significativo de Eosinófilos após tratamentos com Cry1Aa 136 e Cry1Ab 27 mg/Kg, corroborando a indicação de uma possível indução de processo alérgico, visto que Eosinófilos ocorrem em baixas concentrações no sangue periférico de camundongos e seu aumento pode estar relacionado a processos alérgicos (EVERDS, 2007).

As proteínas Cry são moléculas globulares constituídas de três domínios estruturais conectados por blocos altamente conservados (De MAAGD *et al.*, 1999b; De MAAGD *et al.*, 2001). Os três domínios estão organizados com alto grau de semelhança e conferem às toxinas Cry um modo de ação semelhante (De MAAGD *et al.*, 2001). Por exemplo, Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac têm mais de 95% de identidade na sequência de aminoácidos das suas cadeias protéicas. O domínio I tem mais de 98% de similaridade, entretanto, nos domínios II e III há diferenças importantes que distinguem cada uma entre si. Cry1Ab e Cry1Ac compartilham do mesmo domínio II, enquanto Cry1Aa tem apenas 69% de semelhança. Além disto, as regiões envolvidas na interação com o receptor são diferentes em Cry1Aa. Por outro lado, o domínio III tem um alto grau de similaridade para as Cry1Aa e Cry1Ab, enquanto Cry1Ac tem apenas 38% de semelhança com ambas. Assim, os domínios II e III parecem influenciar o espectro tóxico e a atividade inseticida de cada Cry1A (GÓMEZ *et al.*, 2006), corroborando os resultados obtidos no presente estudo nas comparações entre toxinas e em relação à dose-efeito. Para esta última análise, os resultados dependeram não só dos esporos cristais estudados, mas também do tipo de exposição. Entretanto, para a maioria dos tratamentos, os efeitos citotóxicos foram proporcionais ao aumento das concentrações nas duas vias de

administração, exceto para o teste do micronúcleo na via oral, onde os eventos citotóxicos e genotóxicos não se apresentaram associados com o aumento da dose.

Concluindo, os esporos-cristais de Bt apresentaram hematotoxicidade, que variou de acordo com a via de administração e o tipo de esporo-cristal estudado. A via i.p. apresentou-se, como esperado, mais agressiva do que a via oral para a linhagem leucocitária e para a medula óssea, apresentando também efeitos genotóxicos que não foram observados na via oral. Entretanto, os resultados da via oral indicaram que as toxinas Bt não são inócuas para vertebrados e que maiores estudos deveriam ser realizados antes de uma maior disponibilização de produtos Bt transgênicos no meio ambiente e para o consumo animal e humano. Testes de biossegurança são necessários para gerenciar riscos eminentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PERFEROEN, M.; GÜERECAL, L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuide). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p. 203-212, 1996.

ARONSON, A. L., BECKMAN W., DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, v. 50, p. 1-24, 1986.

BEAMONTE, A.; GOLDFAIN-BLANC, F.; CASADEVALL, N.; BAZOT, D.; BERTHEUX, H.; CLAUDE, N. A case of drug-induced hematotoxicity: from *in vivo* to *in vitro* assessment. **Comparative Clinical Pathology**, v. 14, p. 61-65, 2005.

BISHOP, A. H.; JOHNSON, C.; PERANI, M. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 375-380, 1999.

BRAVO, A.; SÁNCHEZ, J.; KOUSKOURA, T.; CRICKMORE, N. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 23985-23987, 2002.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In **Comprehensive Molecular Insect Science**. GILBERT, L. I.; KOSTAS, I.; GILL, S. S.; (eds), Elsevier, v. 6, p. 175-206, 2005.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, 2007.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos plantas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 843-850, p. 843-850, 2003.

CRICKMORE, N. Beyond the spore –past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 616-619, 2006.

De MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 1, p. 9-13, 1999a.

De MAAGD, R. A. b; BAKKER, P. L.; MASSON, L.; ADANG, M. J.; SANGADALA, S.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 463-471, 1999b.

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, n. 4, p. 193-199, 2001.

DU, C.; NICKERSON, K. W. *Bacillus thuringiensis* HD73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3722-3726, 1996.

ESTRUCH, J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W., KOZIEL, M. G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 137-141, 1997.

EVERDS, E. Hematology of the laboratory mouse. In: FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISON, M. T.; NEWCOMER, C. E.; QUIMBY, F. W.; SMITH, A. L. **The mouse in Biomedical research – Normative Biology, Husbandry, and Models**. California: Academic Press, v. 3, 2 ed., p. 133-170, 2006.

FEDERICI, B. A. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, p. 30-38, 2005.

FINAMORE, A.; ROSELLI, M.; BRITTI, S.; MONASTRA, G.; AMBRA, R.; TURRINI, A.; MENGHERI, E. Intestinal and peripheral immune response to MON810 Maize ingestion in weaning and old mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11533-11539, 2008.

FISCHHOFF, D. A. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biotechnology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

GIZZARELLI, F.; BARLETTA, S. C.; LACOVACCI, P.; BRUNETTO, B.; BUTTERONI, C.; AFFERNI, C.; ONORI, R.; MIRAGLIA, M.; PANZINI, G.; *et al.*; Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 238-248, 2006.

GÓMEZ, I.; ARENAS, I.; BENITEZ, I.; MIRANDA-RÍOZ, J.; BECERRIL, B.; *et al.* Specific Epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the Sequential Interaction with Cadherin and Aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34032-34039, 2006.

GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L. E., *et al.* Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, v. 28, n. 1, p. 169-173, 2007.

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.; OLIVEIRA, R.; DOMINGUES, I.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G.; SOARES, A. M. Genotoxic evaluation of different delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. **Mutation Research**, v. 672, n. 2, p. 119-123, 2009.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.

- HUANG, J.; HU, R.; PRAY, C.; QIAO, F.; ROZELLE, S. Biotechnology as an alternative to chemical pesticides: a case study of Bt cotton in China. **Agricultural Economics**, v. 29, p. 55-67, 2003.
- JAOUA, S.; ZOUARI, N.; TOUNSI, S.; ELLOUZ, R. Study of the  $\delta$ -endotoxins produced by three recently isolated strains of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 349-354, 1996.
- KLETER, A. G.; BHULA, R.; BODNARUK, K.; CARAZO, E.; FELSOT, A. S. *et al.* Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. **Pest Management Science**, v.39, p.159-162, 2007.
- KOTZE, A. C.; O'GRADY, J.; GOUGH, J. M.; *et al.* Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal of Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 1013-1022, 2005.
- LI, J.; DERBYSHIRE, D. J.; PROMDONKOY, B.; ELLAR, D. J. Structural implications for the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, pt. 4, p. 571-577, 2001.
- LORENZI, T. F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., p. 710, 2006.
- MacGREGOR, J. The In vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. **Toxicological Sciences**, v. 14, n. 3, p. 513-522, 1990.
- MONNERAT, R.; Masson, L.; BROUSSEAU, R.; CAREY, M. P.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, v. 39, p. 159-162, 1999.
- MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. **Controle Biológico**, v. 3, p. 163-200, 2000.
- MORENO-FIERROS, L.; GARCIA, N.; GUTIERREZ, R.; LOPEZ-REVILLA, R.; VAZQUEZ-PADRON, R. I. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 8, p. 885-890, 2000.
- OECD, 1986. Safety considerations for industrial, agricultural and environmental applications of organisms derived by recombinant DNA techniques. Recombinant DNA safety Considerations. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), p.1-74, 1986.
- OECD, 2007. Consensus Document on Safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* – derived insect control proteins. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), p.1-109, 2007.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E. P. J.; MALONE, L. A. Effects of Plants Genetically Modified for insect resistance on Nontarget Organisms. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 271-292, 2005.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; *et al.* Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n.1, p. 11-16, 2004.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA p. 173-178, 2003.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SÉRALINI, G. E.; CELLIER, D.; De VENDOMOIS, J. S. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 4, p. 596-602, 2007.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, p. 13-21, 2001.

TOJO, A.; AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombix mori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 576-580, 1983.

VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I.; MORENO-FIERROS, L.; NERI-BAZÁN, L.; DE LA RIVA, G. A.; LÓPEZ-REVILLA, R. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody response in mice. **Life Sciences**, v. 64, p. 1897-1912, 1999.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia - Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, p. 1081, 2004.

ZIEMANN, C.; HANSEN, T.; POHLMANN, G.; FARRAR, D.; POHLENZ-MICHEL, C.; TILMANN, T. MANGELSDORF, I. Genotoxicity testing of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) in a mouse bone marrow micronucleus test complemented with hematological endpoints. **Mutation Research**, v. 697, p. 38-46, 2010.

ZHONG, C.; ELLAR, D. J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S.; HART, E. R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin which is toxic to insects in three Orders. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, p. 131-139, 2000.

## 6 CAPÍTULO II - Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis kurstaki* administrados por via oral em doses simples e combinadas

### 6.1 INTRODUÇÃO

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é um agente de controle microbiano que produz diversidades de toxinas entomopatogênicas (SCHNEPF *et al.*, 1998; De MAAGD *et al.*, 2001). Sua principal característica é a síntese de delta-endotoxinas ( $\delta$ -endotoxinas), que são inclusões protéicas cristalinas paraesporais denominadas de proteínas cristal (Cry) - ou toxinas Cry - e proteínas citolíticas (Cyt) (YAMOTO, 1983; WHITELEY; SCHNEPF, 1986), com atividade tóxica a larvas de insetos e a pequenos invertebrados suscetíveis (PRAÇA *et al.*, 2004; FEDERICI, 2005). O Bt tem especificidade por insetos de diversas Ordens (ZHONG *et al.*, 2000) e as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa são mais efetivas contra larvas de lepidópteras (PRAÇA *et al.*, 2004). A clonagem e a modificação de genes *cry*, codificadores de toxinas Cry, permitem a sua ampla expressão em plantas-Bt transgênicas (FISCHHOFF *et al.*, 1987; ESTRUCH *et al.*, 1997; BRAVO *et al.*, 2007).

Plantas-Bt apresentam-se resistentes ao inseto predador e caracterizam-se por expressar uma ou mais toxinas Cry, simultaneamente (FISCHHOFF *et al.*, 1987; OECD, 2007; BOBROWSKI *et al.*, 2003). As Cry têm sido empregadas no controle de pragas agrícolas há mais de 50 anos por meio da sua pulverização foliar, em alternativa aos tradicionais inseticidas químicos (HÖFTE; WHITELEY, 1989). O uso conjugado destas toxinas fornece bons resultados contra insetos-praga (BOBROWSKI *et al.*, 2003; GASSMANN *et al.*, 2009), muito embora, sua permanência na planta seja afetada por fatores ambientais, como a chuva e a degradação por raios ultravioleta (UV) (De MAAGD *et al.*, 1999).

Uma das vantagens inerentes ao cultivo de plantas-Bt é a expressão contínua de toxinas Cry (KLETER *et al.*, 2007) que dispensa, portanto, a pulverização periódica de bioinseticidas (De MAAGD *et al.*, 1999; PINTO; FIUZA, 2008). Além disso, a expressão gênica impossibilita um eventual efeito sinérgico que possa ocorrer entre elas e os esporos ou, às demais toxinas provenientes de Bt. Os cultivos de milho-Bt, algodão-Bt, soja-Bt, dentre outros, encontram-se em expansão, favorecendo economicamente países da América do Norte, parte da América Central e do Sul, Europa, Índia, China e sul da África (HUANG, *et al.*, 2003; KLETER *et al.*, 2007; ARJUNAN e QAIM, 2009).

A introdução de plantas-Bt em cultivo extensivo, por outro lado, suscitou uma apreensão em nível mundial associada a questões de biossegurança, sobretudo, de organismos não-alvo. Além disso, certas perspectivas estão para serem avaliadas como o aumento da biodisponibilidade destas toxinas no ambiente, o potencial de integração horizontal e vertical do transgene e, o desenvolvimento de populações de insetos resistentes (OECD, 1986; O'CALLAGHAN *et al.*, 2004). Esta última já foi observada para os inseticidas sintéticos e, mais recentemente, para algumas toxinas de Bt, tanto em laboratório quanto em campo (GASSMANN *et al.*, 2009).

Uma das soluções para retardar o aparecimento de pragas resistentes é o manejo de áreas de refúgios que propicie o escape de indivíduos suscetíveis (CRUZ, 2002; GASSMANN *et al.*, 2009). Outra estratégia é a utilização conjugada de toxinas Cry efetivas para uma mesma espécie-alvo (HÖFTE; WHITELEY, 1989). O uso ou a expressão concomitante de combinações binárias de Cry minimiza a chance de, no inseto, dois receptores enzimáticos sofrerem ao mesmo tempo mutações, impedindo a ação tóxica.

Além das combinações, os avanços na engenharia genética prometem a expressão de múltiplas toxinas Cry em plantas-Bt para a seleção mais efetiva de pragas suscetíveis (BETZ *et al.*, 2000). Portanto, estudos em espécies não-alvo são exigências de protocolos internacionais para se verificar os efeitos adversos destas toxinas, assegurando a biossegurança ambiental, humana e dos demais vertebrados (OECD, 2007). Neste trabalho, abordamos testes de toxicidade e genotoxicidade, bem como hematológicos, utilizando esporos-cristais em doses simples e combinadas, aplicados a camundongos Swiss.

## 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar prováveis efeitos hematotóxicos dos esporos-cristais Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, provenientes de estirpes do *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* em camundongos Swiss.
- Avaliar a toxicidade e genotoxicidade desses esporos-cristais, em doses simples e combinadas, verificando-se dose-efeito.
- Comparar tempos diferentes de exposição, observando-se o potencial tóxico e genotóxico dos esporos-cristais na administração via oral.

## 6.3 MATERIAL E MÉTODO

### 6.3.1 Obtenção das toxinas esporo-cristal

Os esporos-cristais Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa provenientes do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* são oriundos do Banco de Germoplasma da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária) – CENARGEN (Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia), Brasília - DF e, foram processados segundo protocolo próprio, cedidos sob forma de liofilizados. Em cada esporo-cristal está presente apenas uma variedade de proteína Cry.

### 6.3.2 Camundongos

O projeto de registro UnBDOC nº 32942/2009 (em anexo) foi deferido pelo Comitê de Ética do Uso Animal – CEUA – da Universidade de Brasília – UnB, Brasil e os testes *in vivo* atenderam às exigências propostas. Os camundongos selecionados para o estudo são da linhagem não-isogênica Swiss e, foram disponibilizados pelos biotérios da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo - USP, campus Ribeirão Preto, SP, da Bioagri Laboratórios Ltda. -BIOAGRI, DF e do Biotério Central da Universidade de Brasília - UnB, campus Darci Ribeiro, DF. Até a utilização em experimento, eles foram armazenados no biotério do Laboratório de Genética e Nanobiotecnologia - UnB, e acondicionados em caixas contendo maravalha autoclavada, alimentados com ração *ad libitum* e água filtrada. O período de climatização dos animais foi de pelo menos sete dias e, em cada teste foi utilizado um número amostral (N) de seis camundongos com idade aproximada de três meses, sendo 50% do sexo masculino e 50% do sexo feminino, que receberam numeração individual no decorrer dos experimentos.

### 6.3.3 Administração via oral (p.o.)

Os esporos-cristais Cry foram ressuspensos em água destilada, temperatura de 37° C, agitados por 10 minutos e administrados via oral por gavagem. A dose máxima é 10 vezes maior que a dose mínima e a dose média equivale aproximadamente metade da dose máxima. A dose mínima foi baseada na dose de 27 mg/Kg do controle positivo com ciclofosfamida, e esta, já é conhecida por causar citotoxicidade e genotoxicidade em camundongos na concentração testada.

Portanto:

Dose mínima = 27 mg/Kg peso;

Dose média = 136 mg/Kg peso;

Dose máxima = 270 mg/Kg peso;

Foram administradas doses simples e combinadas dos quatro esporos-cristais em diferentes tempos de exposição. As doses mínima, média e máxima de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram testadas em experimento com tempo de exposição de 24 horas, enquanto que para os tempos de 72 horas e sete dias foi empregada apenas a dose máxima de 270 mg/Kg peso. Para cada tempo de exposição foram realizados seus respectivos controles, controle negativo (C) com água, e controle positivo (CP) com ciclofosfamida na dose de 27mg/Kg peso, processados conforme os itens 3.4, 3.5 e 3.6 para o tempo de 24 horas, e nos tempos de 72 horas e sete dias foram processados conforme o item 3.4.

As combinações Cry1Aa+1Ab, Cry1Aa+1Ac, Cry1Aa+2Aa, Cry1Ab+1Ac, Cry1Ab+2Aa, Cry1Ac+2Aa foram testadas apenas na dose máxima de 270 mg/Kg peso e em exposição de 24 horas. Dos camundongos em exposição de 24 horas foram coletados sangue circulante e medula óssea (itens 3.4, 3.5 e 3.6). Todavia, na exposição de 72 horas e sete dias coletou-se apenas sangue circulante (item 3.4).

#### 6.3.4 Coleta de sangue periférico

Uma alíquota de 400  $\mu$ L de sangue periférico foi coletada por punção cardíaca, utilizando-se seringas descartáveis de 1 mL, enxaguadas com EDTA. Cerca de 10  $\mu$ L de sangue foi utilizado para a confecção de esfregaço sanguíneo; o restante foi transferido para tubos tipo *Eppendorf* contendo 40  $\mu$ L de EDTA 20%, para ser processado em um hematocitômetro veterinário automático, calibrado para camundongos, marca Sysmex poch-100iV Diff.

Após a confecção do esfregaço sanguíneo, foram deixadas para secar a temperatura ambiente por 12 horas, fixadas em metanol por 5 minutos e coradas com 300  $\mu$ L de solução estoque de Wright-Giemsa por 3 minutos e 30 segundos (1,5 g de Wright, 0,17 g de Giemsa, 500 mL de metanol e 15 mL de glicerina). Imediatamente após, cada lâmina foi totalmente coberta pela solução tampão de fosfato A e B (16,8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 8,16 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  diluídos em 1 L de água destilada), pH 6,8, na proporção de 1:1, por 4 minutos. A seguir,

foram lavadas em água corrente e secadas naturalmente. As análises manuais de Leucócitos foram realizadas quando necessárias.

Foram analisados os seguintes parâmetros do hemograma: Eritrócitos, hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT) e índices hematimétricos (volume corpuscular médio ou VCM, hemoglobina corpuscular média ou HCM, concentração hemoglobínica corpuscular média ou CHCM, e amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos Eritrócitos ou RDW – do inglês *Red Cell Distribution Width*), Leucócitos totais, Linfócitos, neutrófilos + monócitos, Eosinófilos, Plaquetas e índices plaquetários (volume plaquetário médio ou VPM; percentagem de Plaquetas gigantes ou P-LCR e amplitude ou variação da distribuição do tamanho das Plaquetas ou PDW – do inglês *Platelet Distribution Width*).

#### 6.3.5 Obtenção de medula óssea femoral

A coleta de medula óssea seguiu protocolo de Schmid (1975) com adaptações. Os fêmures foram extraídos com auxílio de material cirúrgico e as suas epífises foram cortadas a fim de expor o canal medular. A medula óssea foi coletada com auxílio de uma agulha acoplada em seringa descartável de 1 mL contendo soro fetal bovino – SFB, em temperatura ambiente. O material foi acondicionado em tubos plásticos de 10 mL e centrifugado a uma velocidade de 5000 x g. Do sobrenadante, reservou-se uma alíquota de 50 µL que foi homogeneizada com o precipitado. Deste homogeneizado, cerca de 10 µL foram utilizados para a confecção de lâminas de vidro próprias para análises em microscópio de luz.

As lâminas confeccionadas secaram em temperatura ambiente por um período de 24 horas e, posteriormente, foram fixadas em metanol por cinco minutos. Para a observação em microscopia, elas foram coradas com solução estoque de Giemsa (1 g de Giemsa, 54 mL de glicerol e 4 mL de metanol) na proporção de 1 mL para 30 mL de tampão fosfato pH 6,8 A e B, 1:1, (16,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 8,16 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> diluídos em 1 L de água destilada) por nove minutos. Foram então enxaguadas em água corrente filtrada e secadas naturalmente.

#### 6.3.6 Teste do Micronúcleo

As análises foram feitas em microscopia de luz com aumento de 1000 x, em microscópio Zeiss Axioskop 2. Para a contagem eritrocitária foi utilizado um contador manual. O potencial genotóxico das toxinas Cry foi avaliado pela quantificação de micronúcleos (MN) em Eritrócitos policromáticos (EPC) e em Eritrócitos normocromáticos

(ENC) de um total de 4000 células, sendo 2000 EPC e 2000 ENC. A citotoxicidade das Cry foi avaliada pela razão percentual de Eritrócitos policromáticos (%EPC) por normocromáticos (%ENC), isto é, quando atingidas 2000 células por qualquer uma das duas populações, registrou-se, portanto, o valor da sua correspondente. Este percentual foi calculado a partir da fórmula descrita a seguir:

$$\%EPC = \left[ \frac{EPC}{EPC + ENC} \right] \times 100$$

### 6.3.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o software aplicativo SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 15.0. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As variáveis contínuas foram testadas para distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Possíveis diferenças entre os grupos analisados foram investigadas pelo teste de Kruskal-Wallis, visto que os dados não se apresentaram normalmente distribuídos. Para os resultados significativos, foi usado o teste de Mann-Whitney para verificar diferenças entre os tratamentos (comparações 2 a 2).

Os Valores-p com significado estatístico ( $p < 0,05$ ) só foram considerados quando também assumiram sentido biológico e, para tanto, atenderam aos seguintes critérios:

- C comparado com todos os grupos.
- CP comparado com os tratamentos dos respectivos tempos de exposição ou entre CP de tempos de exposição diferentes.
- Quando eram os tratamentos com as mesmas toxinas comparadas entre si no mesmo tempo de exposição, porém, em doses diferentes. Ou então na dose de 270 mg/Kg, mas em tempos diferentes (24 h, 72 h, 7 dias).
- Quando eram tratamentos com toxinas simples e distintas comparadas na mesma dose e mesmo tempo de exposição. Ou então na dose de 270 mg/Kg, nos tempos de 24, 72 h e 7 dias.
- Entre tratamentos com combinações e doses simples - desde que esta tivesse aparecido na combinação - na dose de 270 mg/Kg, no tempo de 24 h.
- Os tratamentos com as combinações comparados entre si.

## 6.4 RESULTADOS

### 6.4.1 Eritrograma

#### 6.4.1.1 Tempo de 24 horas

##### 6.4.1.1.1 Avaliação nas doses simples

Os tratamentos com Cry1Ab 136 mg/Kg e Cry2Aa 27 mg/Kg ( $p= 0,006$  para ambos), e Cry1Ac 270 mg/Kg ( $p= 0,011$ ) promoveram redução significativa nos valores de HCM em relação ao controle negativo, ocorrendo o mesmo em relação ao controle positivo ( $p= 0,004$  para Cry1Ab 136 mg/Kg e Cry2Aa 27 mg/Kg;  $p= 0,009$  para Cry1Ac 270 mg/Kg). O tratamento com Cry1Aa a 27 mg/Kg ( $p= 0,034$ ) promoveu aumento significativo no valor de CHCM em relação ao controle negativo, mas não foi verificada diferenças significativas para CHCM em relação ao controle positivo (Tabela 1).

Todos os tratamentos com os esporos-cristais promoveram reduções significativas nos valores de VCM em relação ao controle negativo ( $p= 0,004$  para Cry1Aa 27 mg/Kg;  $p= 0,003$  para Cry1Ac 27 mg/Kg;  $p= 0,000$  para os demais tratamentos). Efeito semelhante foi observado em relação ao controle positivo para todos os tratamentos com Cry ( $p= 0,015$  para Cry1Aa 27 mg/Kg;  $p= 0,012$  para Cry1Ac 27 mg/Kg;  $p= 0,000$  para os demais tratamentos).

Em relação ao controle negativo, redução significativa da anisocitose (avaliada por RDW) foi observada para a maioria dos tratamentos com Cry, com exceção de Cry1Ac 27 e 270 mg/Kg ( $p= 0,041$  para Cry1Ab e Cry1Ac a 136 mg/Kg;  $p= 0,002$  para os restantes dos tratamentos). Os tratamentos com Cry1Aa a 27 ( $p= 0,041$ ) e a 136 mg/Kg ( $p= 0,015$ ) também promoveram redução significativa no percentual de RDW em comparação ao controle positivo. Quanto à dose-efeito, tais valores foram significativamente maiores para Cry1Aa na dose de 270 mg/Kg em relação à dose de 136 mg/Kg ( $p= 0,004$ ). Entre toxinas, o tratamento com Cry1Ac na dose de 27 mg/Kg ocasionou aumento significativo de RDW em relação aos tratamentos com Cry1Aa e Cry1Ab ( $p= 0,009$  para ambos), e Cry2Aa ( $p= 0,026$ ). Na dose de 136 mg/Kg tais aumentos foram observados para Cry1Ab ( $p= 0,009$ ), Cry1Ac ( $p= 0,005$ ) e Cry2Aa ( $p= 0,014$ ) em relação a Cry1Aa.

#### 6.4.1.1.2 Avaliação nas doses combinadas

Os tratamentos com as combinações Cry1Ab+2Aa ( $p= 0,004$ ) e Cry1Ac+2Aa ( $p= 0,000$ ) ocasionaram reduções significativas nos valores de HCM quando comparadas aos valores dos controles negativo e positivo ( $p= 0,003$  para Cry1Ab+2Aa;  $p= 0,000$  para Cry1Ac+2Aa) (Tabela 1).

Todas as combinações promoveram reduções significativas nos valores de VCM em relação aos controles negativo e positivo ( $p= 0,000$  para todos os tratamentos em relação aos dois controles). Resultados semelhantes foram também observados para RDW em relação ao controle negativo ( $p= 0,009$  para Cry1Ac+2Aa,  $p= 0,002$  para o restante dos tratamentos) e em relação controle positivo para os tratamentos Cry1Aa+1Ab e Cry1Aa+2Aa ( $p= 0,026$  para ambos), e Cry1Aa+1Ac ( $p= 0,026$ ).

Entre combinações, os valores de RDW apresentaram-se significativamente aumentados para o tratamento com Cry1Ac+2Aa em comparação aos tratamentos com Cry1Aa+1Ab e Cry1Aa+1Ac ( $p= 0,041$ ).

#### 6.4.1.1.3 Avaliação entre doses simples e combinadas

O tratamento com Cry1Aa promoveu aumento significativo no índice RDW em relação à combinação Cry1Aa+1Ab ( $p= 0,041$ ) (Tabela 1).

#### 6.4.1.2 Tempo de 72 horas

Em relação ao controle negativo, foram verificadas diferenças significativas para HCM, VCM e RDW. O tratamento Cry1Ac reduziu significativamente o valor de HCM quando comparado ao controle negativo ( $p= 0,040$ ). No entanto, para VCM, o controle positivo ( $p= 0,026$ ) e os tratamentos com Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa promoveram reduções significativas nos valores ( $p= 0,002$  para estes três últimos tratamentos), também observadas em RDW ( $p= 0,002$  para CP, Cry1Ab e Cry2Aa,  $p= 0,041$  para Cry1Ac). Já em relação ao controle positivo, os percentuais de RDW tiveram aumentos significativos ocasionadas pelos tratamentos com Cry1Ac ( $p= 0,004$ ) e Cry2Aa ( $p= 0,009$ ) (Tabela 1).

Entre toxinas, o número de Eritrócitos foi significativamente maior após tratamentos com Cry2Aa ( $p= 0,030$ ) em relação à Cry1Aa. Efeitos semelhantes em HGB ( $p= 0,041$ ) e HCT ( $p= 0,015$ ) foram promovidos pelo tratamento com Cry2Aa também em relação ao

tratamento com Cry1Aa. Entretanto, o tratamento com Cry1Aa promoveu aumento significativo nos valores de VCM quando comparado aos tratamentos Cry2Aa ( $p= 0,009$ ) e Cry1Ac ( $p= 0,026$ ).

#### 6.4.1.3 Tempo de 7 dias

Em relação ao controle negativo, o tratamento Cry1Ab promoveu redução significativa de HGB ( $p= 0,009$ ) e HCT ( $p= 0,002$ ). Da mesma forma, os tratamentos com as Cry ocasionaram diminuições significativas de HCM ( $p= 0,006$  para Cry1Ab;  $p= 0,016$  para Cry1Ac;  $p= 0,011$  para Cry2Aa), tal como de VCM, inclusive o controle positivo, que também diminuiu significativamente os valores para tal variável ( $p= 0,002$  para Cry1Aa;  $p= 0,001$  para Cry1Ab;  $p= 0,000$  para Cry1Ac;  $p= 0,003$  para Cry2Aa e  $p= 0,011$  para CP). Além disso, o controle positivo e os tratamentos com as Cry, com exceção de Cry1Ab, promoveram queda significativa nos valores de RDW ( $p= 0,041$  para CP e Cry1Aa;  $p= 0,004$  para Cry1Ac e Cry2Aa). Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao controle positivo (Tabela1).

Os tratamentos Cry1Ac ( $p= 0,003$ ) e Cry2Aa ( $p= 0,009$ ) promoveram aumentos significativos de Eritrócitos em relação ao tratamento com Cry1Ab. Tais tratamentos também causaram elevações significativas de HGB ( $p= 0,009$  para Cry1Ac e  $p= 0,015$  para Cry2Aa) e HCT ( $p= 0,009$ ) quando comparados ao tratamento Cry1Ab.

#### 6.4.1.4 Entre o tempo de 24 h e 72 horas

Para o controle positivo, os índices VCM ( $p= 0,041$ ) e RDW ( $p= 0,026$ ) foram significativamente maiores no tempo de 24 horas. Em relação aos tratamentos, no tempo de 72 horas o tratamento Cry1Aa promoveu reduções significativas nos valores de valores Eritrócitos ( $p= 0,012$ ), HGB ( $p= 0,041$ ) e de HCT ( $p= 0,015$ ) em relação aos seus correspondentes no tempo de 24 horas. O tratamento com Cry1Ab também promoveu diminuição significativa de HGB ( $p= 0,026$ ) no tempo de 72 horas ( $p= 0,041$ ) (Tabela 1).

#### 6.4.1.5 Entre o tempo de 24 h e 7 dias

Os valores de VCM ( $p= 0,004$ ) no controle positivo foram significativamente maiores após a exposição de 24 horas em relação ao tempo de 7 dias. Para os tratamentos, no tempo de 7 dias Cry1Aa promoveu redução significativa nos HGB ( $p= 0,009$ ) e HCT ( $p= 0,004$ ), enquanto que para RDW ( $p= 0,015$ ) aumentou significativamente os valores, quando comparados aos seus respectivos tratamentos no tempo de 24 horas. Do mesmo modo, o tratamento com Cry1Ab no tempo de 7 dias promoveu redução significativa de Eritrócitos ( $p= 0,002$ ), HGB ( $p= 0,004$ ) e HCT ( $p= 0,015$ ) em relação à exposição de 24 horas (Tabela 1).

#### 6.4.1.6 Entre o tempo de 72 h e 7 dias

Na exposição de 7 dias os valores de HGB ( $p= 0,041$ ) e HCT ( $p= 0,015$ ) foram significativamente maiores em relação ao tempo de 72 horas, promovidos pelo tratamento Cry1Ab (Tabela 1).

### 6.4.2 Leucograma

#### 6.4.2.1 Tempo de 24 horas

##### 6.4.2.1.1 Avaliação nas doses simples

A única diferença significativa que ocorreu em comparação ao controle negativo foi o aumento significativo de Linfócitos após tratamento com Cry1Ab a 27 mg/Kg ( $p= 0,041$ ). Relação de dose-efeito foi observada para os tratamentos com Cry1Ab, com aumento significativo de Leucócitos totais e Linfócitos na dose de 27 mg/Kg em relação às doses de 136 ( $p= 0,015$  para Leucócitos totais;  $p= 0,002$  para Linfócitos) e 270 mg/Kg ( $p= 0,026$  para Leucócitos totais;  $p= 0,015$  para Linfócitos). Também foram observadas diferenças significativas para Neutrófilos+Monócitos após tratamento com Cry1Ab, onde a dose de 136 mg/Kg apresentou valores significativamente aumentados destas células em relação à dose de 270 mg/Kg ( $p=0,009$ ). Entre toxinas, na dose de 27 mg/Kg, o tratamento com Cry2Ab reduziu significativamente Linfócitos quando comparado aos tratamentos com Cry1Aa ( $p= 0,041$ ), Cry1Ab ( $p= 0,002$ ) e Cry1Ac ( $0,015$ ). Já na dose de 136 mg/Kg, o tratamento com Cry1Ab promoveu redução de Linfócitos em relação à Cry1Aa ( $p= 0,026$ ) (Tabela 2).

#### 6.4.2.1.2 Avaliação nas doses combinadas

Não ocorreram diferenças significativas para o Leucograma.

#### 6.4.2.1.3 Avaliação entre doses simples e combinadas

Nenhuma diferença significativa entre doses simples e combinadas foi observada para Leucócitos totais, Linfócitos e Eosinófilos. Contudo, Neutrófilos+Monócitos apresentaram aumento significativo após os tratamentos com as combinações Cry1Aa+1Ab ( $p= 0,002$ ) e Cry1Ab+1Ac ( $p= 0,026$ ) em relação ao tratamento com Cry1Ab (Tabela 2).

#### 6.4.2.2 Tempo de 72 horas

Em relação ao controle negativo, o tratamento com Cry1Aa provocou aumento significativo de Neutrófilos+Monócitos ( $p= 0,003$ ). O mesmo ocorrendo em relação ao controle positivo, cujos valores de Leucócitos totais e Monócitos+Neutrófilos foram significativamente aumentados após tratamentos com Cry1Aa. O tratamento com Cry1Aa também ocasionou aumentos significativos nos valores de Leucócitos totais em relação aos tratamentos com Cry1Ab ( $p= 0,015$ ) e Cry1Ac ( $p= 0,009$ ), bem como de Neutrófilos+Monócitos, em relação aos tratamentos com Cry1Ab ( $p= 0,016$ ), Cry1Ac ( $p= 0,004$ ) e Cry2Aa ( $p= 0,002$ ) (Tabela 2).

#### 6.4.2.3 Tempo de 7 dias

Em comparação ao controle negativo, o controle positivo ( $p= 0,026$ ) e os tratamentos com Cry1Ac e Cry2Aa ( $p= 0,041$  para ambos) promoveram aumento significativo de Leucócitos totais. Tal resultado foi relacionado ao aumento de Neutrófilos+Monócitos ( $p= 0,004$  para controle positivo;  $p= 0,026$  para Cry1Ac e Cry2Aa). O tratamento com Cry1Ab ( $p= 0,002$ ) provocou redução significativa nos valores de Linfócitos, enquanto que Cry2Aa ( $p= 0,026$ ) promoveu aumento significativo nos valores. No entanto, ambos os tratamentos Cry1Aa ( $p= 0,041$ ) e Cry1Ab ( $p= 0,026$ ) ocasionaram aumento significativo de Eosinófilos (Tabela 2).

O tratamento com Cry1Aa também ocasionou aumento significativo de Eosinófilos quando comparado ao controle positivo ( $p= 0,041$ ) e ao tratamento com Cry2Aa ( $p= 0,009$ ). Em relação ao controle positivo, o tratamento com Cry1Ab promoveu redução significativa de

Leucócitos totais ( $p= 0,009$ ) associada à diminuição significativa de Linfócitos ( $p= 0,002$ ). Leucócitos totais e Linfócitos também foram significativamente reduzidos após tratamentos com Cry1Ab em relação aos tratamentos Cry1Ac e Cry2Aa ( $p= 0,009$  e  $p= 0,015$  para Cry1Ac;  $p= 0,041$  e  $p= 0,002$  para Cry2Aa - em relação a Leucócitos totais e Linfócitos, respectivamente). Entretanto, do mesmo modo que o tratamento com Cry1Aa, Cry1Ab gerou aumento significativo de Eosinófilos em relação ao tratamento com Cry2Aa ( $p= 0,015$ ).

#### 6.4.2.4 Entre o tempo de 24 h e 72 horas

Foram verificadas diferenças significativas somente para Neutrófilos+Monócitos após o tratamento com Cry1Aa, os quais se apresentaram significativamente mais elevados no tempo de 72 horas ( $p= 0,015$ ) (Tabela 2).

#### 6.4.2.5 Entre o tempo de 24 h e 7 dias

Em relação ao controle positivo, no tempo de 24 horas os valores de Neutrófilos+Monócitos foram significativamente maiores quando comparado no tempo de 7 dias ( $p= 0,041$ ). Para os tratamentos, no tempo de 24 horas os valores de Linfócitos foram significativamente maiores para Cry1Ab ( $p= 0,002$ ), e significativamente menores para tratamento com Cry2Aa ( $p= 0,015$ ) em relação aos seus correspondentes no tempo de 7 dias. Aumentos significativos de Eosinófilos também foram promovidos pelo tratamento Cry1Aa ( $p= 0,041$ ) no tempo de 7 dias (Tabela 2).

#### 6.4.2.6 Entre o tempo de 72 h e 7 dias

Os valores de Leucócitos totais ( $p= 0,009$ ), Linfócitos ( $p= 0,015$ ) e Neutrófilos+Monócitos ( $p= 0,015$ ) tiveram reduções significativas promovidas pelo tratamento com ciclofosfamida (controle positivo) no tempo de 72 horas em relação ao de 7 dias. O número de Leucócitos totais foi significativamente reduzido após tratamento com Cry1Ac ( $p= 0,002$ ) no tempo de 72 horas, enquanto o tratamento Cry1Ab ( $p= 0,004$ ) promoveu aumento significativo de Linfócitos nesse tempo. O tratamento Cry2Aa promoveu aumentos significativos nos valores de Neutrófilos+Monócitos após tratamento no tempo de 7 dias ( $p= 0,026$ ) em relação ao seu correspondente no tempo de 72 horas (Tabela 2).

### 6.4.3 Plaquetograma

#### 6.4.3.1 Tempo de 24 horas

##### 6.4.3.1.1 Avaliação nas doses simples

Em relação ao controle negativo, o controle positivo promoveu reduções significativas de Plaquetas ( $p= 0,026$ ), enquanto o tratamento Cry1Aa a 27 mg/Kg ( $p= 0,009$ ) ocasionou aumento significativo de PLT. Por outro lado, o tratamento com Cry1Aa 27 mg/Kg ( $p= 0,015$ ) provocou diminuição significativa nos valores de VPM, enquanto o tratamento Cry1Ac 136 mg/Kg ( $p= 0,019$ ) promoveu aumento significativo nos valores. De forma semelhante, para P-LCR os tratamentos com Cry1Aa a 27 ( $p= 0,026$ ) e 136 mg/Kg ( $p= 0,041$ ) ocasionaram redução significativa nos valores, entretanto, o tratamento com Cry1Ac a 136 mg/Kg ( $p= 0,038$ ) provocou aumento significativo para tal variável. Os valores de PDW foram significativamente menores após tratamento com Cry2Aa na dose de 270 mg/Kg ( $p= 0,026$ ) (Tabela 3).

Em comparação com controle positivo, na dose de 27 mg/Kg os tratamentos com Cry1Aa ( $p= 0,002$ ), Cry1Ac e Cry2Aa ( $p= 0,041$  para ambos) promoveram aumentos significativos de Plaquetas, também observado na dose de 270 mg/Kg para Cry1Aa ( $p= 0,041$ ). Para VPM, somente o tratamento Cry1Aa 27 mg/Kg ( $p= 0,041$ ) provocou redução significativa nos valores. Já para PDW, houve redução significativa nos valores após tratamentos com Cry1Aa 27 e 270 mg/Kg ( $p= 0,041$  para ambos), Cry1Ab a 27 mg/Kg ( $p= 0,026$ ) e Cry1Ac ( $p= 0,038$ ) 270 mg/Kg .

Quanto à relação de dose-efeito, o tratamento com Cry1Aa na dose 136 mg/Kg promoveu redução significativa de Plaquetas quando comparado ao da dose de 27 mg/Kg ( $p= 0,015$ ), e redução significativa de PDW em relação ao tratamento na dose de 270 mg/Kg ( $p= 0,009$ ). Foram verificados aumentos significativos nos valores de VPM, P-LCR e PDW promovidos pelo tratamento com Cry1Ac na dose de 136 mg/Kg em relação às doses 27 mg/Kg e 270 mg/Kg (à 27 mg/Kg  $p= 0,010$  para VPM e P-LCR e; à 270 mg/Kg  $p= 0,029$  para VPM e P-LCR). O tratamento com Cry1Ac na dose de 136 mg/Kg também promoveu aumento significativo de PDW em relação à dose de 270 mg/Kg ( $p= 0,038$ ). Entre toxinas, na dose de 27 mg/Kg, o número de Plaquetas foi significativamente maior após tratamentos com Cry1Aa quando comparado à Cry1Ab ( $p= 0,015$ ), Cry1Ac ( $p= 0,009$ ). Na de dose 270 mg/Kg, os valores de Plaquetas também foram significativamente maiores após tratamento

com 1Aa em comparação à Cry2Aa ( $p= 0,041$ ). Para VPM, na dose de 27 mg/Kg o tratamento com Cry1Aa ocasionou redução significativa nos valores em relação ao tratamento com Cry1Ac ( $p= 0,026$ ). O tratamento com Cry1Aa também promoveu redução significativa de VPM em relação aos tratamentos com Cry1Ac ( $p= 0,010$ ) e Cry2Aa ( $0,026$ ), na dose 136 mg/Kg. Nesta mesma dose, o tratamento Cry1Ac provocou aumento significativo de VPM em relação à Cry2Aa ( $p= 0,010$ ). Semelhantemente, o percentual de P-LCR teve aumento significativo após administração de Cry1Ac em relação aos tratamentos com Cry1Aa e Cry2Aa ( $p= 0,010$  para Cry1Aa e  $p= 0,019$  para Cry2Aa). O tratamento com Cry1Ac também promoveu aumento significativo nos valores de PDW em relação à Cry1Aa e Cry1Ab na dose de 27 mg/Kg ( $p= 0,026$  para ambos), e à Cry1Aa na dose de 136 mg/Kg ( $p= 0,038$ ). Já na dose de 270 mg/Kg o tratamento com Cry1Ab promoveu aumento significativo de PDW em relação à Cry1Aa ( $p= 0,041$ ).

#### 6.4.3.1.2 Avaliação nas doses combinadas

Em relação ao controle negativo, o tratamento com a combinação Cry1Aa+2Aa ( $p= 0,002$ ) promoveu redução significativa de Plaquetas, tal como o tratamento Cry1Ab+2Aa ( $p= 0,024$ ) ocasionou diminuição significativa nos valores de VPM. A combinação Cry1Ab+1Ac também causou redução significativa nos valores de PDW tanto em relação ao controle negativo ( $p= 0,030$ ) quanto ao controle positivo ( $p= 0,017$ ). Em relação ao controle positivo, o tratamento com Cry1Ab+2Aa ( $p= 0,024$ ) também provocou diminuição significativa nos valores de PDW (Tabela 3).

Entre combinações, Cry1Aa+2Aa promoveu diminuição significativa de Plaquetas em relação à combinação Cry1Ab+1Ac ( $p= 0,015$ ). Já para VPM e RDW ( $p= 0,036$  para ambos), o tratamento Cry1Aa+2Aa promoveu aumento significativo para tais variáveis quando comparada à combinação Cry1Ab+2Aa).

#### 6.4.3.1.3 Avaliação entre doses simples e combinadas

A combinação Cry1Aa+2Aa promoveu queda significativa de Plaquetas em relação ao tratamento em dose simples com Cry1Aa ( $p= 0,009$ ), ao contrário dos valores de PDW, em esta combinação ocasionou aumento significativo nos valores em relação a Cry1Aa ( $p= 0,009$ ). O mesmo sendo observado para as combinações Cry1Aa+1Ab e Cry1Aa+1Ac ( $p= 0,015$  para ambos), cujos valores de PDW foram significativamente aumentados quando

comparados ao tratamento com Cry1Aa. Para VPM, o tratamento com Cry1Ab provocou aumento significativo nos valores em relação à combinação Cry1Ab+2Aa ( $p= 0,024$ ). De forma semelhante, os tratamentos em doses simples com Cry1Ab ( $p= 0,048$ ) e Cry2Aa ( $p= 0,024$ ) promoveram aumento significativo de P-LCR em relação à combinação Cry1Ab+2Aa (Tabela 3).

#### 6.4.3.2 Tempo de 72 horas

Em relação ao controle negativo, o tratamento Cry1Aa ocasionou diminuições significativas de VPM ( $p= 0,026$ ) e P-LCR ( $p= 0,002$ ). Quanto a relação de dose-efeito, o tratamento com Cry1Aa promoveu redução significativa de P-LCR quando comparado aos tratamentos com Cry1Ab e Cry1Ac ( $p= 0,010$ ), e Cry2Aa ( $p= 0,017$ ) (Tabela 3).

#### 6.4.3.3 Tempo de 7 dias

O controle positivo ( $p= 0,041$ ) ocasionou diminuição significativa de P-LCR, enquanto o tratamento com Cry1Ab ( $p= 0,048$ ) promoveu aumento significativo nos valores, ambos comparados ao controle negativo. Semelhantemente em relação ao controle positivo o tratamento Cry1Ab também provocou aumento significativo de P-LCR. Reduções significativas nos valores de Plaquetas também foram verificadas após tratamento com Cry1Ab em relação aos tratamentos com Cry1Ac ( $p= 0,001$ ) e Cry2Aa ( $p= 0,003$ ). Para VPM, aumento significativo foi promovido pelo tratamento Cry1Ab em relação à Cry1Ac ( $p= 0,036$ ) (Tabela 3).

#### 6.4.3.5 Entre o tempo de 24 h e 72 horas

Não foram verificadas diferenças significativas para Plaquetograma entre estes tempos de exposição.

#### 6.4.3.5 Entre o tempo de 24 h e 7 dias

Tanto para o tratamento com Cry1Aa quanto para Cry1Ab ( $p= 0,041$  para ambos) no tempo de 7 dias os valores de Plaquetas apresentaram-se significativamente menores em relação aos seus correspondentes no tempo de 24 horas (Tabela 3).

#### 6.4.3.6 Entre o tempo de 72 h e 7 dias

O tratamento Cry1Ab promoveu redução significativa de Plaquetas no tempo de 7 dias em relação ao tempo de 72 horas ( $p= 0,041$ ). Já os valores de VPM e P-LCR ( $p= 0,009$  para ambos) foram significativamente maiores após tratamento com Cry1Aa no tempo de 7 dias (Tabela 3).

### 6.4.4 Teste do Micronúcleo

#### 6.4.4.1 Tempo de 24 horas

##### 6.4.4.1.1 Avaliação nas doses simples

Em relação ao controle negativo, nenhuma diferença significativa foi observada para MN-ENC e MN-EPC. No entanto, o controle positivo ( $p= 0,004$ ) e os tratamentos com Cry1Aa a 136 mg/Kg ( $p=0,041$ ), Cry1Ab nas doses de 27 ( $p= 0,009$ ) e 136 mg/Kg ( $p= 0,026$ ), Cry1Ac a 136 mg/Kg e Cry2Aa à 27 mg/Kg ( $p= 0,009$  para ambos) promoveram reduções significativas no índice de proliferação celular (%EPC) (Tabela 4).

Em relação ao controle positivo, reduções significativas de MN-ENC foram provocadas pelos tratamentos Cry1Aa a 27 ( $p= 0,009$ ) e 136 mg/Kg ( $p= 0,015$ ) e Cry2Aa a 136 ( $p= 0,015$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,004$ ). Os tratamentos Cry2Aa a 27 ( $p= 0,004$ ) e 270 mg/Kg ( $p= 0,002$ ) também promoveram diminuições significativas de MN-EPC. Enquanto que os tratamentos com Cry1Aa ( $p= 0,015$ ) e Cry1Ab ( $p= 0,009$ ) na dose de 270 mg/Kg provocaram aumentos significativos na frequência de EPC, demonstrando a eficiência da ciclofosfamida sobre a medula óssea de camundongos.

Quanto à relação de dose-efeito, foram observadas diferenças significativas para as variáveis MN-EPC e %EPC. Os valores de MN-EPC diminuíram significativamente após tratamento com Cry2Aa a 270 mg/Kg em relação a dose de 136 mg/Kg ( $p= 0,015$ ). Aumento

significativo de %EPC foi promovido pelo tratamento Cry1Ab a 270 mg/Kg quando comparado às doses de 27 e 136 mg/Kg ( $p= 0,026$  para ambos). Entre toxinas, na dose de 27 mg/Kg o tratamento com Cry1Ac aumentou significativamente os valores de MN-ENC em relação ao tratamento com Cry1Aa ( $p= 0,026$ ), enquanto que para MN-EPC, Cry1Ac provocou aumento significativo nos valores em relação à Cry2Aa ( $p= 0,004$ ). Da mesma forma, os tratamentos com Cry1Aa ( $p= 0,004$ ) e Cry1Ab ( $p= 0,002$ ) promoveram aumento significativo de MN-EPC quando comparados à Cry2Aa. Na dose de 136 mg/Kg o tratamento com Cry1Ac promoveu aumento significativo de MN-ENC e MN-EPC quando comparado aos tratamentos com Cry1Aa ( $p= 0,026$  para MN-ENC e  $p= 0,015$  para MN-EPC) e Cry2Aa ( $p= 0,026$  MN-ENC e  $p= 0,009$  para MN-EPC). Na dose de 270 mg/Kg, após tratamento com Cry1Ac os valores de MN-ENC ( $p= 0,004$ ) e de MN-EPC ( $p= 0,002$ ) foram significativamente aumentados em relação ao tratamento com Cry2Aa. O tratamento com Cry1Aa também aumentou MN-EPC quando comparado à Cry2Aa ( $p= 0,002$ ).

#### 6.4.4.1.2 Avaliação nas doses combinadas

Em relação ao controle negativo, as combinações Cry1Aa+2Aa, Cry1Ab+2Aa, Cry1Ac+2Aa ( $p= 0,026$  para os três tratamentos) promoveram reduções significativas no %EPC. Quando comparado ao controle positivo, quase todos os tratamentos, com exceção da combinação Cry1Ab+2Aa, provocaram diminuição significativa nos valores de MN-ENC ( $p= 0,026$  para Cry1Aa+1Ab e Cry1Ac+2Aa;  $p= 0,009$  Cry1Aa+1Ac;  $p= 0,004$  Cry1Aa+2Aa;  $p= 0,026$  para Cry1Ac+2Aa. De forma semelhante, com exceção das combinações Cry1Aa+1Ab, Cry1Ab+2Aa e Cry1Ac+2Aa, tais tratamentos também ocasionaram reduções significativas nos valores de MN-EPC ( $p= 0,004$  para Cry1Aa+1Ac e Cry1Aa+2Aa, e  $p= 0,026$  para Cry1Ab+1Ac). Entretanto, a combinação Cry1Ab+1Ac ( $p= 0,009$ ) promoveu aumento significativo no índice de proliferação celular (%EPC) (Tabela 4).

Entre toxinas, a combinação Cry1Ab+2Aa causou aumento significativo nos valores de MN-EPC quando comparada aos tratamentos Cry1Aa+1Ac e Cry1Aa+2Aa ( $p= 0,015$  para ambos). O tratamento com Cry1Ab+1Ac promoveu diminuição significativa na frequência de EPC em relação à combinação Cry1Ac+2Aa ( $p= 0,041$ ).

#### 6.4.4.1.3 Avaliação entre doses simples e combinadas

O tratamento Cry1Ac promoveu aumento significativo nos valores de MN-ENC quando comparado às combinações Cry1Aa+1Ac ( $p= 0,009$ ), Cry1Ab+1Ac e Cry1Ac+2Aa ( $p= 0,015$  para ambos). O mesmo foi observado para MN-EPC, cujos valores foram significativamente maiores após tratamento com Cry1Ac em relação a esses tratamentos ( $p= 0,002$  para Cry1Aa+1Ac;  $p= 0,015$  para Cry1Ab+1Ac e  $p= 0,026$  para Cry1Ac+2Aa). O tratamento com Cry1Aa também ocasionou aumento significativo de MN-EPC em comparação às combinações Cry1Aa+1Ac e Cry1Aa+2Aa ( $p= 0,002$  ambos). Por outro lado, o tratamento com Cry2Aa promoveu diminuição significativa de MN-EPC em relação às combinações Cry1Ab+2Aa ( $p= 0,004$ ) e Cry1Ac+2Aa ( $p= 0,026$ ). Para %EPC o tratamento com Cry1Aa provocou aumento significativo no valor de tal variável em relação à combinação Cry1Aa+1Ab ( $p= 0,041$ ) (Tabela 4).

**Tabela 1** – Resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa na concentração de 27 e 136 mg/Kg administrados oralmente (*per os*, p.o.) com uma única administração no tempo 24 h antes do sacrifício, e na concentração de 270 mg/Kg em exposição de 24 h, 72 h ou 7 dias antes do sacrifício. Camundongos controle receberam água destilada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg.

G	Tratamento	Eritrócitos	HGB	HCT	HCM	CHCM	VCM	RDW
		(x 10 <sup>6</sup> /μL)	(g/dL)	(%)	(pg)	(g/dL)	(fL)	(%)
1	Água Filtrada	7,53 ± 0,28	11,90 ± 0,44	30,38 ± 1,02	15,83 ± 0,09	39,12 ± 0,41	40,40 ± 0,40	17,83 ± 0,41
2	CP 27 mg/Kg, 24 h	7,60 ± 0,12	12,05 ± 0,26	30,57 ± 0,66	15,85 ± 0,16	39,45 ± 0,75	40,22 ± 0,46	16,80 ± 0,60
3	Cry1Aa 27 mg/Kg, 24 h	8,25 ± 0,13	12,78 ± 0,21	30,90 ± 0,36	15,50 ± 0,25	41,36 ± 0,38*	37,50 ± 0,43**	14,94 ± 0,54**
4	Cry1Aa 136 mg/Kg, 24 h	7,92 ± 0,14	12,19 ± 0,31	29,84 ± 0,68	15,37 ± 0,19	40,81 ± 0,32	37,64 ± 0,28**	14,16 ± 0,38**
5	Cry1Aa 270 mg/Kg, 24 h	8,35 ± 0,20	12,40 ± 0,29	31,08 ± 0,71	14,85 ± 0,16	39,88 ± 0,34	37,22 ± 0,12**	15,38 ± 0,21**
6	Cry1Ab 27 mg/Kg, 24 h	8,17 ± 0,22	12,55 ± 0,42	31,13 ± 0,89	15,35 ± 0,22	40,30 ± 0,38	38,12 ± 0,21**	15,35 ± 0,31*
7	Cry1Ab 136 mg/Kg, 24 h	7,69 ± 0,09	11,23 ± 0,25	28,55 ± 0,62	14,62 ± 0,21**	39,35 ± 0,26	37,12 ± 0,42**	16,65 ± 0,56**
8	Cry1Ab 270 mg/Kg, 24 h	8,19 ± 0,16	12,63 ± 0,20	30,77 ± 0,53	15,45 ± 0,18	41,07 ± 0,33	37,60 ± 0,17**	15,70 ± 0,36**
9	Cry1Ac 27 mg/Kg, 24 h	7,98 ± 0,12	12,25 ± 0,24	30,42 ± 0,56	15,33 ± 0,20	40,28 ± 0,56	38,08 ± 0,22**	16,93 ± 0,36
10	Cry1Ac 136 mg/Kg, 24 h	8,11 ± 0,32	12,12 ± 0,40	29,92 ± 1,02	14,98 ± 0,22	40,53 ± 0,47	36,93 ± 0,23**	16,18 ± 0,67*
11	Cry1Ac 270 mg/Kg, 24 h	8,17 ± 0,35	11,98 ± 0,39	29,68 ± 1,07	14,67 ± 0,21*	40,42 ± 0,32	36,37 ± 0,35**	16,17 ± 0,67
12	Cry2Aa 27 mg/Kg, 24 h	8,24 ± 0,18	12,02 ± 0,15	29,95 ± 0,53	14,62 ± 0,22**	40,15 ± 0,35	36,40 ± 0,36**	15,02 ± 0,52**
13	Cry2Aa 136 mg/Kg, 24 h	7,86 ± 0,23	11,68 ± 0,33	29,05 ± 0,77	14,87 ± 0,10	40,22 ± 0,18	36,97 ± 0,31**	15,47 ± 0,30**
14	Cry2Aa 270 mg/Kg, 24 h	7,75 ± 0,27	11,82 ± 0,37	28,97 ± 0,89	15,27 ± 0,17	40,82 ± 0,42	37,42 ± 0,29**	15,62 ± 0,34**
15	Cry1Aa+1Ab 270 mg/Kg, 24 h	8,30 ± 0,18	12,45 ± 0,30	31,15 ± 0,78	15,00 ± 0,1	40,00 ± 0,23	37,53 ± 0,28**	14,87 ± 0,12**
16	Cry1Aa+1Ac 270 mg/Kg, 24 h	8,47 ± 0,42	12,93 ± 0,63	31,78 ± 1,25	15,30 ± 0,13	40,60 ± 0,48	37,63 ± 0,39**	14,85 ± 0,46**

	mg/Kg, 24 h							
17	Cry1Aa+2Aa 270	8,46 ± 0,14	12,70 ± 0,09	31,77 ± 0,24	15,03 ± 0,19	39,98 ± 0,27	37,57 ± 0,47**	14,95 ± 0,32**
	mg/Kg, 24 h							
18	Cry1Ab+1Ac 270	8,03 ± 0,15	12,17 ± 0,29	29,63 ± 0,78	15,15 ± 0,21	41,08 ± 0,28	36,88 ± 0,47**	15,48 ± 0,39**
	mg/Kg, 24 h							
19	Cry1Ab+2Aa 270	8,20 ± 0,16	11,95 ± 0,10	29,83 ± 0,35	14,58 ± 0,23**	40,07 ± 0,24	36,42 ± 0,48**	15,38 ± 0,43**
	mg/Kg, 24 h							
20	Cry1Ac+2Aa 270	8,33 ± 0,17	11,95 ± 0,21	30,50 ± 0,47	14,37 ± 0,33**	39,18 ± 0,48	36,70 ± 0,53**	15,82 ± 0,37**
	mg/Kg, 24 h							
	<b>P-valores 24 horas</b>	0,075	0,072	0,179	0,000	0,002	0,000	0,000
21	CP 27 mg/Kg, 72 h	7,72 ± 0,28	11,65 ± 0,28	29,30 ± 0,76	15,13 ± 0,34	39,75 ± 0,27	38,03 ± 0,60*	15,02 ± 0,22**
22	Cry1Aa 270	6,86 ± 0,47	10,77 ± 0,65	26,73 ± 1,59	15,77 ± 0,29	40,28 ± 0,45	39,15 ± 0,54	16,57 ± 0,67
	mg/Kg, 72 h							
23	Cry1Ab 270	7,92 ± 0,29	11,87 ± 0,26	29,83 ± 0,81	15,02 ± 0,31	39,82 ± 0,44	37,75 ± 0,47**	15,40 ± 0,62**
	mg/Kg, 72 h							
24	Cry1Ac 270	8,17 ± 0,19	11,97 ± 0,44	30,28 ± 0,88	14,63 ± 0,27*	39,48 ± 0,46	37,07 ± 0,56**	16,40 ± 0,36*
	mg/Kg, 72 h							
25	Cry2Aa 270	8,30 ± 0,22	12,38 ± 0,31	30,67 ± 0,78	14,92 ± 0,16	40,38 ± 0,22	36,95 ± 0,52**	15,82 ± 0,10**
	mg/Kg, 72 h							
	<b>P-valores 72 horas</b>	0,027	0,300	0,213	0,014	0,211	0,002	0,004
26	CP 27 mg/Kg, 7 dias	8,10 ± 0,28	12,25 ± 0,34	30,82 ± 0,87	15,15 ± 0,13	39,75 ± 0,25	38,13 ± 0,41*	16,32 ± 0,59*
27	Cry1Aa 270	7,12 ± 0,30	10,77 ± 0,44	26,88 ± 0,99	15,13 ± 0,26	40,00 ± 0,25	37,80 ± 0,57**	16,38 ± 0,46*
	mg/Kg, 7 dias							
28	Cry1Ab 270	6,53 ± 0,38	9,68 ± 0,58**	24,55 ± 1,36**	14,83 ± 0,15**	39,38 ± 0,40	37,63 ± 0,37**	17,02 ± 0,54
	mg/Kg, 7 dias							
29	Cry1Ac 270	8,16 ± 0,10	12,17 ± 0,26	30,38 ± 0,48	14,92 ± 0,26*	40,03 ± 0,31	37,27 ± 0,47**	16,03 ± 0,33**
	mg/Kg, 7 dias							
30	Cry2Aa 270	7,99 ± 0,20	11,90 ± 0,31	30,25 ± 0,77	14,88 ± 0,09*	39,33 ± 0,34	37,85 ± 0,28**	15,92 ± 0,41**
	mg/Kg, 7 dias							
	<b>P-valores 7 dias</b>	0,001	0,000	0,000	0,004	0,293	0,000	0,059
	<b>P-valores</b>	0,000	0,002	0,007	0,000	0,001	0,000	0,000

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). G= grupo; HGB: Hemoglobina; HCT: Hematócrito; VCM = Volume Corpuscular Médio; MCH: Hemoglobina Corpuscular Média; MCHC = Concentração Média Corpuscular da Hemoglobina; RDW = (representa uma indicação de um grupo de variações – anisocitose – no tamanho celular); g/dL= gramas por decilitros; fl= fentolitros; pg= picograma. Os valores de p foram gerados pelo teste Kruskal-Wallis. Os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) e altamente significativas (p<0,01) detectadas pelo teste de Mann Whitney nas comparações 2 a 2 com o controle negativo.

**Tabela 2** – Resultados do leucograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa na concentração de 27 e 136 mg/Kg administrados oralmente (*per os*, p.o.) com uma única administração no tempo 24 h antes do sacrifício, e na concentração de 270 mg/Kg em exposição de 24 h, 72 h ou 7 dias antes do sacrifício. Camundongos controle receberam água destilada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg.

<b>G</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Leucócitos totais</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	<b>Linfócitos</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	<b>Neutrófilos+ Monócitos</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	<b>Eosinófilos</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)
1	Água filtrada	4,63 ± 0,74	3,35 ± 0,55	1,22 ± 0,20	0,07 ± 0,05
2	CP 27 mg/Kg, 24 h	5,37 ± 0,77	3,73 ± 0,53	1,58 ± 0,34	0,05 ± 0,03
3	Cry1Aa 27 mg/Kg, 24 h	6,32 ± 0,85	4,94 ± 0,73	1,38 ± 0,14	0,00 ± 0,00
4	Cry1Aa 136 mg/Kg, 24 h	5,53 ± 0,52	4,20 ± 0,45	1,27 ± 0,11	0,06 ± 0,04
5	Cry1Aa 270 mg/Kg, 24 h	5,47 ± 0,77	3,93 ± 0,77	1,47 ± 0,31	0,07 ± 0,03
6	Cry1Ab 27 mg/Kg, 24 h	6,82 ± 0,62	5,13 ± 0,33*	1,68 ± 0,33	0,00 ± 0,00
7	Cry1Ab 136 mg/Kg, 24 h	4,60 ± 0,49	2,60 ± 0,42	1,92 ± 0,45	0,08 ± 0,03
8	Cry1Ab 270 mg/Kg, 24 h	4,60 ± 0,47	3,53 ± 0,43	0,98 ± 0,10	0,08 ± 0,04
9	Cry1Ac 27 mg/Kg, 24 h	6,90 ± 0,89	4,25 ± 0,45	2,52 ± 0,66	0,13 ± 0,10
10	Cry1Ac 136 mg/Kg, 24 h	6,78 ± 1,66	4,00 ± 0,97	2,48 ± 0,56	0,30 ± 0,24
11	Cry1Ac 270 mg/Kg, 24 h	5,17 ± 0,66	3,55 ± 0,66	1,60 ± 0,37	0,02 ± 0,02
12	Cry2Aa 27 mg/Kg, 24 h	4,38 ± 0,63	2,43 ± 0,36	1,90 ± 0,53	0,05 ± 0,02
13	Cry2Aa 136 mg/Kg, 24 h	4,68 ± 1,06	3,05 ± 0,91	1,50 ± 0,32	0,13 ± 0,06
14	Cry2Aa 270 mg/Kg, 24 h	5,03 ± 0,78	2,98 ± 0,28	2,02 ± 0,73	0,03 ± 0,02
15	Cry1Aa+1Ab 270 mg/Kg, 24 h	5,97 ± 0,52	4,28 ± 0,54	1,67 ± 0,08	0,02 ± 0,02
16	Cry1Aa+1Ac 270 mg/Kg, 24 h	4,10 ± 0,69	2,85 ± 0,58	1,20 ± 0,28	0,05 ± 0,02
17	Cry1Aa+2Aa 270 mg/Kg, 24 h	4,92 ± 0,84	3,38 ± 0,84	1,43 ± 0,52	0,10 ± 0,05
18	Cry1Ab+1Ac 270 mg/Kg, 24 h	4,72 ± 0,59	3,18 ± 0,51	1,42 ± 0,13	0,12 ± 0,08
19	Cry1Ab+2Aa 270 mg/Kg, 24 h	4,78 ± 0,54	3,47 ± 0,48	1,28 ± 0,24	0,03 ± 0,02
20	Cry1Ac+2Aa 270 mg/Kg, 24 h	4,63 ± 0,70	3,13 ± 0,51	1,48 ± 0,40	0,02 ± 0,02
<b>P-valores 24 horas</b>		0,454	0,095	0,758	0,486

<b>21</b>	CP 27 mg/Kg, 72 h	3,37 ± 0,78	2,40 ± 0,46	0,95 ± 0,41	0,02 ± 0,02
<b>22</b>	Cry1Aa 270 mg/Kg, 72 h	6,53 ± 0,82	3,42 ± 0,41	2,98 ± 0,43**	0,13 ± 0,08
<b>23</b>	Cry1Ab 270 mg/Kg, 72 h	4,27 ± 0,36	2,72 ± 0,16	1,48 ± 0,29	0,07 ± 0,03
<b>24</b>	Cry1Ac 270 mg/Kg, 72 h	3,72 ± 0,35	2,37 ± 0,35	1,25 ± 0,13	0,10 ± 0,06
<b>25</b>	Cry2Aa 270 mg/Kg, 72 h	4,80 ± 0,57	3,58 ± 0,46	1,18 ± 0,15	0,03 ± 0,02
<b>P-valores 72 horas</b>		<b>0,059</b>	<b>0,331</b>	<b>0,000</b>	<b>0,557</b>
<b>26</b>	CP 27 mg/Kg, 7 dias	7,22 ± 0,68*	4,33 ± 0,4	2,82 ± 0,35**	0,07 ± 0,03
<b>27</b>	Cry1Aa 270 mg/Kg, 7 dias	6,70 ± 1,83	3,30 ± 0,77	3,15 ± 1,20	0,25 ± 0,08*
<b>28</b>	Cry1Ab 270 mg/Kg, 7 dias	3,90 ± 0,58	1,85 ± 0,10**	1,77 ± 0,42	0,28 ± 0,08*
<b>29</b>	Cry1Ac 270 mg/Kg, 7 dias	6,58 ± 0,50*	3,85 ± 0,62	2,63 ± 0,60*	0,10 ± 0,04
<b>30</b>	Cry2Aa 270 mg/Kg, 7 dias	7,85 ± 1,37*	5,33 ± 0,89*	2,48 ± 0,55*	0,03 ± 0,02
<b>P-valores 7 dias</b>		<b>0,034</b>	<b>0,006</b>	<b>0,092</b>	<b>0,015</b>
<b>P-valores</b>		<b>0,015</b>	<b>0,004</b>	<b>0,034</b>	<b>0,024</b>

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). G= grupo. Os valores de p foram gerados pelo teste Kruskal-Wallis. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) e altamente significativas ( $p < 0,01$ ) detectadas pelo teste de Mann Whitney nas comparações 2 a 2 com o controle negativo.

**Tabela 3** - Resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa na concentração de 27 e 136 mg/Kg administrados oralmente (*per os*, p.o.) com uma única administração no tempo 24 h antes do sacrifício, e na concentração de 270 mg/Kg em exposição de 24 h, 72 h ou 7 dias antes do sacrifício. Camundongos controle receberam água destilada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg.

<b>G</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Plaquetas</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	<b>VPM</b> (fl)	<b>P-LCR</b> (%)	<b>PDW</b> (fl)
1	Água filtrada	1219,00 ± 56,64	6,93 ± 0,10	10,88 ± 0,81	6,95 ± 0,11
2	CP 27 mg/Kg, 24 h	978,67 ± 93,57*	7,10 ± 0,30	11,23 ± 2,33	7,25 ± 0,24
3	Cry1Aa 27 mg/Kg, 24 h	1431,60 ± 27,40**	6,38 ± 0,15*	7,32 ± 1,15*	6,74 ± 0,05
4	Cry1Aa 136 mg/Kg, 24 h	1243,57 ± 113,56	6,56 ± 0,14	7,91 ± 1,14*	6,77 ± 0,07
5	Cry1Aa 270 mg/Kg, 24 h	1292,00 ± 74,24	6,75 ± 0,15	11,15 ± 1,68	6,53 ± 0,07
6	Cry1Ab 27 mg/Kg, 24 h	1168,00 ± 73,22	6,62 ± 0,17	9,93 ± 1,10	6,63 ± 0,10
7	Cry1Ab 136 mg/Kg, 24 h	1076,00 ± 148,54	6,85 ± 0,22	10,73 ± 1,74	6,75 ± 0,16
8	Cry1Ab 270 mg/Kg, 24 h	1020,50 ± 113,38	7,05 ± 0,16	12,33 ± 1,35	6,87 ± 0,11
9	Cry1Ac 27 mg/Kg, 24 h	1224,67 ± 58,93	6,90 ± 0,09	9,63 ± 0,88	7,03 ± 0,10
10	Cry1Ac 136 mg/Kg, 24 h	955,83 ± 183,68	7,48 ± 0,10*	15,35 ± 0,80*	7,13 ± 0,09
11	Cry1Ac 270 mg/Kg, 24 h	1213,50 ± 133,20	6,83 ± 0,16	10,78 ± 0,78	6,63 ± 0,08
12	Cry2Aa 27 mg/Kg, 24 h	1282,33 ± 110,10	6,90 ± 0,16	10,24 ± 0,87	6,92 ± 0,14
13	Cry2Aa 136 mg/Kg, 24 h	1146,83 ± 62,99	6,97 ± 0,09	11,13 ± 0,94	6,9 ± 0,07
14	Cry2Aa 270 mg/Kg, 24 h	1057,50 ± 65,31	7,00 ± 0,10	11,78 ± 0,42	6,80 ± 0,13*
15	Cry1Aa+1Ab 270 mg/Kg, 24 h	1090,33 ± 69,82	6,80 ± 0,09	10,22 ± 0,61	6,83 ± 0,08
16	Cry1Aa+1Ac 270 mg/Kg, 24 h	1187,33 ± 156,68	6,77 ± 0,13	9,78 ± 1,04	6,80 ± 0,06
17	Cry1Aa+2Aa 270 mg/Kg, 24 h	942,67 ± 44,98**	7,00 ± 0,11	11,78 ± 1,17	6,88 ± 0,07
18	Cry1Ab+1Ac 270 mg/Kg, 24 h	1171,67 ± 60,58	6,78 ± 0,16	11,16 ± 1,45	6,54 ± 0,10*
19	Cry1Ab+2Aa 270 mg/Kg, 24 h	1110,50 ± 69,8	6,57 ± 0,03*	9,23 ± 0,38	6,57 ± 0,09
20	Cry1Ac+2Aa 270 mg/Kg, 24 h	1164,67 ± 105,33	7,00 ± 0,16	12,35 ± 1,34	6,75 ± 0,18

<b>P-valores 24 horas</b>		0,048	0,015	0,044	0,005
<b>21</b>	CP 27 mg/Kg, 72 h	1112,17 ± 178,48	6,58 ± 0,15	8,14 ± 1,19	6,78 ± 0,12
<b>22</b>	Cry1Aa 270 mg/Kg, 72 h	1152,33 ± 96,43	6,65 ± 0,10*	7,67 ± 0,43**	6,78 ± 0,15
<b>23</b>	Cry1Ab 270 mg/Kg, 72 h	928,67 ± 92,55	6,93 ± 0,22	11,83 ± 1,55	6,58 ± 0,16
<b>24</b>	Cry1Ac 270 mg/Kg, 72 h	1095,50 ± 96,69	7,13 ± 0,23	12,80 ± 1,39	7,00 ± 0,16
<b>25</b>	Cry2Aa 270 mg/Kg, 72 h	1196,00 ± 67,53	7,16 ± 0,21	12,28 ± 2,12	7,04 ± 0,18
<b>P-valores 72 horas</b>		0,454	0,077	0,010	0,316
<b>26</b>	CP 27 mg/Kg, 7 dias	1345,50 ± 158,38	6,67 ± 0,10	8,80 ± 0,81*	6,72 ± 0,09
<b>27</b>	Cry1Aa 270 mg/Kg, 7 dias	1002,50 ± 101,89	7,23 ± 0,18	12,07 ± 0,96	7,05 ± 0,22
<b>28</b>	Cry1Ab 270 mg/Kg, 7 dias	589,50 ± 92,13	7,47 ± 0,34	15,03 ± 2,23*	6,93 ± 0,29
<b>29</b>	Cry1Ac 270 mg/Kg, 7 dias	1289,00 ± 97,91	6,72 ± 0,10	9,85 ± 0,44	6,68 ± 0,09
<b>30</b>	Cry2Aa 270 mg/Kg, 7 dias	1205,33 ± 88,27	6,92 ± 0,09	9,98 ± 0,82	6,95 ± 0,10
<b>P-valores 7 dias</b>		0,000	0,006	0,034	0,388
<b>P-valores</b>		0,005	0,002	0,002	0,020

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). G= grupo; VPM= volume plaquetário médio; P-LCR= porcentagem de Plaquetas gigantes (do inglês *platelet large cell ratio*) e PDW= amplitude da distribuição das Plaquetas (do inglês *platelet distribution width*). Os valores de p foram gerados pelo teste Kruskal-Wallis. Os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) e altamente significativas (p<0,01) detectadas pelo teste de Mann Whitney nas comparações 2 a 2 com o controle negativo.

**Tabela 4** - Resultados do teste do micronúcleo camundongos Swiss albinos tratados com esporos-cristais de Bt Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa na concentração de 27 e 136 mg/Kg administrados oralmente (*per os*, p.o.) com uma única administração no tempo 24 h antes do sacrifício, e na concentração de 270 mg/Kg em exposição de 24 h, 72 h ou 7 dias antes do sacrifício. Camundongos controle receberam água destilada (controle negativo) ou ciclofosfamida (CP – controle positivo) na concentração de 27 mg/Kg.

G	Tratamento	MN-ENC	Eritrócitos Policromáticos (EPC)	
			MN-EPC	Índice de proliferação celular (%EPC)
1	Água filtrada	2,00 ± 1,44	2,50 ± 1,43	52,61 ± 1,01
2	CP 27 mg/Kg	2,17 ± 0,48	3,50 ± 0,62	45,97 ± 1,21**
3	Cry1Aa 27 mg/Kg	0,40 ± 0,25	3,00 ± 0,55	48,55 ± 1,54
4	Cry1Aa 136 mg/Kg	0,43 ± 0,20	2,29 ± 0,36	49,28 ± 1,36*
5	Cry1Aa 270 mg/Kg	1,00 ± 0,37	3,67 ± 0,56	52,90 ± 1,57
6	Cry1Ab 27 mg/Kg	1,67 ± 0,49	4,67 ± 0,88	45,92 ± 1,54**
7	Cry1Ab 136 mg/Kg	1,50 ± 0,43	3,33 ± 0,33	47,78 ± 1,28*
8	Cry1Ab 270 mg/Kg	1,00 ± 0,37	2,17 ± 0,95	52,91 ± 1,55
9	Cry1Ac 27 mg/Kg	1,33 ± 0,21	3,33 ± 0,76	49,49 ± 2,14
10	Cry1Ac 136 mg/Kg	2,50 ± 0,96	5,17 ± 0,98	44,92 ± 1,87**
11	Cry1Ac 270 mg/Kg	2,17 ± 0,40	4,00 ± 0,73	48,69 ± 1,73
12	Cry2Aa 27 mg/Kg	1,00 ± 0,52	0,83 ± 0,31	47,06 ± 1,25**
13	Cry2Aa 136 mg/Kg	0,50 ± 0,22	2,00 ± 0,45	47,93 ± 1,89
14	Cry2Aa 270 mg/Kg	0,17 ± 0,17	0,50 ± 0,22	48,63 ± 1,39
15	Cry1Aa+1Ab 270 mg/Kg	0,50 ± 0,22	0,67 ± 0,33	45,02 ± 2,27
16	Cry1Aa+1Ac 270 mg/Kg	0,33 ± 0,21	0,83 ± 0,31	46,72 ± 2,10
17	Cry1Aa+2Aa 270 mg/Kg	0,17 ± 0,17	0,83 ± 0,31	48,88 ± 0,56*
18	Cry1Ab+1Ac 270 mg/Kg	0,50 ± 0,22	1,50 ± 0,43	51,46 ± 1,43
19	Cry1Ab+2Aa 270 mg/Kg	1,00 ± 0,45	2,83 ± 0,48	46,50 ± 2,50*
20	Cry1Ac+2Aa 270 mg/Kg	0,50 ± 0,34	1,83 ± 0,48	46,51 ± 2,08*
<b>P-valores</b>		0,001	0,000	0,026

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). G= grupo; MN-ENC e MN-EPC= resultados do teste de micronúcleos para Eritrócitos normocromáticos (ENC) e Eritrócitos policromáticos (EPC), respectivamente. Os valores de p foram gerados pelo teste Kruskal-Wallis. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) e altamente significativas ( $p < 0,01$ ) detectadas pelo teste de Mann Whitney nas comparações 2 a 2 com o controle negativo.

## 6.4 DISCUSSÃO

A evolução de resistência pelo inseto ameaça a eficácia das toxinas Bt, que são amplamente utilizadas nos pulverizadores e em colheitas transgênicas (SOBERÓN *et al.*, 2007). Uma das alternativas usadas para retardar o aparecimento de populações resistentes de insetos-praga é o uso de misturas binárias na agricultura (MANYANGARIRWA *et al.*, 2006). Muitos agricultores fazem o uso de diferentes ingredientes ativos de agrotóxicos para pulverização nas lavouras. No controle biológico de pragas, faz-se também a combinação de diferentes misturas de cepas do esporo cristal do *Bacillus thuringiensis*. Recentemente, o mesmo processo vem acontecendo com a dupla clonagem de genes das  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry) em plantas transgênicas para se evitar a aquisição de resistência. Há misturas onde não ocorre a interação entre os componentes, e outras, onde vários processos interativos podem ocorrer como aditividade, sinergismo, potenciação e antagonismo (CEDERGREEN *et al.*, 2005; MANYANGARIRWA *et al.*, 2006). Desse modo, existem vários exemplos de plantas transgênicas com dupla inserção de genes Bt. Exemplos: algodão Bollgard (Cry1Ac+Cry2Ab), algodão Widestrike (Cry1Ac+Cry1F), milho (Cry1Ac+Cry2Ab) (MANYANGARIRWA *et al.*, 2006). Assim, ambas as toxinas são produzidas simultaneamente nestas plantas. No entanto, até o momento, existem poucos estudos sobre a citotoxicidade das toxinas Bt não-conjugadas para os diferentes organismos, e não foram encontrados estudos na literatura avaliando possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos das combinações binárias das toxinas Cry.

Devido ao seu alto índice mitótico, o tecido hematopoiético torna-se alvo dos efeitos adversos de muitas substâncias químicas que entram no organismo. Algumas substâncias que agem sobre a medula óssea podem ter efeito seletivo, isto é, apresentar toxicidade para uma determinada linhagem celular, por exemplo, citotoxicidade para a linhagem eritróide mediada pela ação sobre o fator de crescimento eritróide. Estudos em ratos mostraram que substâncias com atividade antipsicóticas atingem a medula óssea, entretanto, os Leucócitos e Plaquetas permanecem com os seus valores normais, enquanto a contagem de reticulócitos cai drasticamente. Verificou-se um efeito inibitório somente sobre as células precursoras dos eritrócitos (BEAMONTE *et al.*, 2005). Nosso estudo também verificou citotoxicidade seletiva e demonstrou que tanto as toxinas em doses simples, nos três tempos de exposição, quanto as combinações binárias foram hematotóxicas, particularmente para a linhagem eritróide. No tempo de 24 horas, as quatro toxinas provocaram hipocromia, verificada pela diminuição significativa no HCM. Efeito semelhante foi observado com a maioria das combinações.

Todos os tratamentos com Cry também provocaram microcitose, indicando interferência na hematopoese. Os resultados do teste do micronúcleo corroboraram os resultados da hematologia, visto que todas as toxinas e combinações binárias promoveram redução significativa do índice de proliferação celular da medula óssea. Apesar de a literatura citar que as toxinas Bt são geralmente atóxicas e que não bioacumulam no tecido adiposo nem persistem no ambiente (BETZ *et al.*, 2000), os efeitos hematotóxicos persistiram tanto após 72 horas, quanto 7 dias, sendo mais evidentes no tempo de 7 dias. Neste tempo de exposição, Cry1Ab 270 mg/Kg provocou um quadro de anemia microcítica hipocrômica, com redução significativa de hemoglobina (HGB), HCT, HCM e VCM, sendo os valores de HGB e HCT muito inferiores àqueles reportados como valores de referência (12-15 g/dL para HGB e 35-50% para HCT) para camundongos (VIANNA, 2007). Além disso, há a possibilidade de ter ocorrido lise de células intestinais como indutoras de tal anemia, visto que no tempo de exposição de 7 dias, Cry1Ab 270 mg/Kg também provocou uma redução significativa do número de Plaquetas, sendo tal número muito inferior ao dos valores de referência para camundongos ( $900-1600 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) (EVERDS, 2007). Sendo assim, nossos resultados sugerem a possibilidade da existência de receptores desconhecidos no intestino de vertebrados com afinidade por estas toxinas. Também sugerem a persistência destas toxinas no organismo, com efeitos cumulativos proporcionais ao tempo de exposição do organismo a elas. Um estudo demonstrou em *Daphnia magna* que a ingestão de milho-Bt expressando a toxina Cry1Ab aumentou a mortalidade e reduziu significativamente o desempenho da aptidão em relação aos crustáceos alimentados com milho não-transgênico (BØHN *et al.*, 2008), corroborando nossos resultados.

Já foram demonstradas alterações imunofenotípicas no intestino e em sítios periféricos de camundongos jovens e idosos após ingestão de milho Bt MON810, que codifica a forma ativa de Cry1Ab (FINAMORE *et al.*, 2008). Também tem sido reportado que a administração intragástrica de prototoxina Cry1Ac induziu secreção de anticorpos específicos nas mucosas de camundongos (VÁZQUEZ-PADRÓN *et al.*, 1999), enquanto a exposição dos trabalhadores rurais a sprays de Bt resultou na sensibilização alérgica da pele e na indução de anticorpos IgG e IgE (MORENO-FIERROS *et al.*, 2000). Nossos resultados mostraram indução de Linfócitos por Cry1Ab 27 mg/Kg após a exposição de 24 horas, demonstrando que tal toxina teve atividade leucogênica. Com 72 horas de exposição também se observou leucocitose após administração de Cry1Aa, com aumentos nas quantidades de Neutrófilos+Monócitos. Com 7 dias de exposição os efeitos foram mais evidenciados, sendo que todos os tratamentos com Cry provocaram leucocitose, associada ao aumento de

Leucócitos totais, Linfócitos, Neutrófilos+Monócitos e/ou Eosinófilos. Esses resultados corroboram a sugestão anterior de persistência das toxinas Cry no organismo e que elas não são inócuas para vertebrados.

O teste do micronúcleo em modelos animais tem sido utilizado para avaliar possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos na medula óssea em decorrência da administração de um determinado xenobiótico (GRISOLIA *et al.*, 2002; ZIEMMAN *et al.*, 2010). Nosso estudo mostrou que os tratamentos com Cry, independentemente da dose administrada, e metade das combinações, foram citotóxicos, visto que promoveram redução significativa do índice de proliferação celular da medula óssea. Entretanto, tais toxinas não foram genotóxicas.

Séralini *et al.* (2007) verificaram alterações significativas dose-dependentes no crescimento e peso de ratos após consumo de milho Bt MON863. Também foram observados sinais da toxicidade hepato-renal, marcados por sensibilidades diferenciais nos machos e nas fêmeas, além de aumento de triglicérides nas fêmeas e redução de excreção de fósforo e sódio na urina dos machos. Nas comparações com o controle negativo, nossos resultados também demonstraram que a dose mais alta foi a mais tóxica. Apesar de, para a maioria dos parâmetros analisados no hemograma, os resultados não mostrarem uma relação direta de dose-efeito para hematotoxicidade ou genotoxicidade nas comparações dos esporos-cristais em diferentes concentrações, tal relação foi verificada com Cry2Aa no teste do micronúcleo para citotoxicidade da medula óssea, não sendo significativa, porém, em relação ao controle negativo. Esses resultados confirmam que cada uma das toxinas Cry tem propriedades tóxicas e genotóxicas específicas, como relatado por Grisolia *et al.* (2009).

Entre toxinas, todas apresentaram diferenças significativas entre si, dependendo do parâmetro analisado. Porém, no hemograma, tais diferenças foram observadas para variáveis diferentes, não sendo possível observar um padrão. Já no teste do micronúcleo, a toxina Cry1Ac foi a mais genotóxica nas comparações entre doses simples, visto que induziu mais micronúcleos em todas as doses testadas. A toxina Cry2Aa foi a que proporcionalmente induziu menos micronúcleos, inclusive quando comparadas doses simples x combinadas. Uma vez que estas toxinas não foram genotóxicas em relação ao controle negativo, podemos inferir que entre elas podem existir diferentes padrões de atividade, o que se justifica através de estudos anteriores (GRISOLIA *et al.*, 2009). Tais resultados possivelmente são decorrentes das pequenas diferenças estruturais entre as toxinas Cry.

Grisolia *et al.* (2009) estudaram os efeitos de diferentes combinações binárias das toxinas Cry sobre o peixe *Danio rerio*. Dentre todas as combinações binárias possíveis entre as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A, somente as combinações com a presença da

Cry1Aa apresentaram efeitos genotóxicos. Quando testadas isoladamente, somente a Cry1Aa foi genotóxica. Isso sugere que não houve interação química entre elas, pois o efeito genotóxico observado na combinação binária pode ser atribuído apenas à presença da toxina Cry1Aa. As demais combinações onde a Cry1Aa não estava presente, não apresentaram genotoxicidade. Nossos resultados mostraram que, nas comparações entre toxinas simples x combinadas, Cry1Aa, quando em combinação com Cry1Ac e Cry2Aa, induziu menos micronúcleos do que quando testada isoladamente. Isso pode sugerir que estas toxinas podem ter um efeito antagônico sobre Cry1Aa. O mesmo efeito antagônico ocorreu com Cry1Ac, quando em combinação com as demais toxinas. Ao contrário, Cry2Aa quando em combinação com Cry1Ab e Cry1Ac foi mais genotóxica do que administrada isoladamente. Isso pode significar que a genotoxicidade ocorreu mais em função da presença das outras toxinas do que propriamente de Cry2Aa. Comparando-se combinações x combinações, Cry1Ab+2Aa foi mais genotóxica que Cry1Aa+1Ac e Cry1Aa+2Aa. Quanto à citotoxicidade, Cry1Ab+1Ac foi mais citotóxica do que Cry1Ac+2Aa, sugerindo que a presença de Cry1Ab nas combinações aumenta a genotoxicidade e a citotoxicidade.

Concluindo, nossos resultados mostraram que as toxinas Cry apresentaram hematotoxicidade seletiva, sendo particularmente tóxicas para a linhagem eritróide. Também apresentaram efeito leucogênico, sendo que no tempo de 7 dias os efeitos hematológicos foram mais evidentes, particularmente para o esporo-cristal Cry1Ab 270 mg/Kg, que provocou um quadro de anemia microcítica hipocrômica. A dose mais alta foi a mais tóxica; entretanto para a maioria dos parâmetros analisados, não houve uma relação direta de dose-efeito nas comparações dos esporos-cristais em diferentes concentrações. Entre toxinas, todas apresentaram diferenças significativas entre si, dependendo do parâmetro analisado. Nossos resultados demonstraram que as toxinas Cry não são inócuas para vertebrados e que podem persistir no organismo, aumentando seus efeitos tóxicos com o tempo de exposição prolongado. Levando-se em consideração a exposição contínua de humanos e animais (particularmente os domésticos) em níveis consideráveis de Bt através da dieta, esses resultados sugerem que são necessários protocolos mais eficientes de avaliação, com exposição mais longa dos mamíferos a estas dietas, e envolvendo observações clínicas antes de concluir que os transgênicos Bt são seguros para a alimentação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARJUNAN, S.; QAIM, M. Village-wide effects of Agricultural Biotechnology: the case of Bt Cotton in India. **Word Development**, v.37, n. 1, p. 256-267, 2009.
- BEAMONTE, A.; GOLDFAIN-BLANC, F.; CASADEVALL, N.; BAZOT, D.; BERTHEUX, H.; CLAUDE, N. A case of drug-induced hematotoxicity: from *in vivo* to *in vitro* assessment. **Comparative Clinical Pathology**, v. 14, p. 61-65, 2005.
- BETZ, S. F.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 156-173, 2000.
- BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos plantas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 843-850, p. 843-850, 2003.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, 2007.
- BØHN, T.; PRIMICERIO, R.; HESSEN, D. O.; TRAAVIK, T. Reduced Fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-transgenic maize variety. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 584-592, 2008.
- CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J. Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1676-1683, 2005.
- CRUZ, I. Manejo de Resistência de Insetos-Praga a Inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). **Documentos** 21, Sete Lagoas, MG. Embrapa Milho e Sorgo. p. 15p, 2002.
- De MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 1, p. 9-13, 1999.
- 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, n. 4, p. 193-199, 2001.
- ESTRUCH, J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W., KOZIEL, M. G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 137-141, 1997.
- FEDERICI, B. A. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, p. 30-38, 2005.
- FINAMORE, A.; ROSELLI, M.; BRITTI, S.; MONASTRA, G.; AMBRA, R.; TURRINI, A.; MENGHERI, E. Intestinal and peripheral immune response to MON810 Maize ingestion in weaning and old mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11533-11539, 2008.

FISCHHOFF, D. A. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biotechnology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHINIK, E. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 147-163, 2009.

GIZZARELLI, F.; BARLETTA, S. C.; LACOVACCI, P.; BRUNETTO, B.; BUTTERONI, C.; AFFERNI, C.; ONORI, R.; MIRAGLIA, M.; PANZINI, G.; *et al.*; Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 238-248, 2006.

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.; OLIVEIRA, R.; DOMINGUES, I.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G.; SOARES, A. M. Genotoxic evaluation of different delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. **Mutation Research**, v. 672, n. 2, p. 119-123, 2009.

HÖFTE, H. & WHITELEY, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.

HUANG, J.; HU, R.; PRAY, C.; QIAO, F.; ROZELLE, S. Biotechnology as an alternative to chemical pesticides: a case study of Bt cotton in China. **Agricultural Economics**, v. 29, p. 55-67, 2003.

KLETER, A. G.; BHULA, R.; BODNARUK, K.; CARAZO, E.; FELSOT, A. S. *et al.* Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. **Pest Management Science**, v.39, p.159-162, 2007.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., p. 710, 2006.

MANYANGARIRWA, W.; TURNBULL, M.; McCUTCHEON, G. S.; SMITH, J. P. Gene pyramiding as a Bt resistance management strategy: How sustainable is this strategy? **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 781-785, 2006.

MORENO-FIERROS, L.; GARCIA, N.; GUTIERREZ, R.; LOPEZ-REVILLA, R.; VAZQUEZ-PADRON, R. I. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 8, p. 885-890, 2000.

OECD, 1986. Safety considerations for industrial, agricultural and environmental applications of organisms derived by recombinant DNA techniques. Recombinant DNA safety Considerations. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), p.1-74, 1986.

OECD, 2007. Consensus Document on Safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* – derived insect control proteins. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), p.1-109, 2007.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E. P. J.; MALONE, L. A. Effects of Plants Genetically Modified for insect resistance on Nontarget Organisms. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 271-292, 2005.

PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, p. 159-168, 2008.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; *et al.* Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n.1, p. 11-16, 2004.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 775-806, 1998.

SÉRALINI, G. E.; CELLIER, D.; De VENDOMOIS, J. S. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 4, p. 596-602, 2007.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I., GÓMEZ, I., TABASHNIK, B.E.; BRAVO, A. Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. **Science**, v. 318, p. 1640-1642, 2007.

VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I.; MORENO-FIERROS, L.; NERI-BAZÁN, L.; DE LA RIVA, G. A.; LÓPEZ-REVILLA, R. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody response in mice. **Life Sciences**, v. 64, p. 1897-1912, 1999.

VIANNA, F. A. **Guia terapêutico veterinário**. Minas Gerais: Gráfica Editora Cem, 2 ed., p. 464, 2007.

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.

YAMAMOTO, TAKASHI. Identification of Entomological Toxins of *Bacillus thuringiensis* by high Performance Liquid chromatography. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 2595-2603, 1983.

ZHONG, C.; ELLAR, D. J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S.; HART, E. R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin which is toxic to insects in three Orders. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, p. 131-139, 2000.

ZIEMANN, C.; HANSEN, T.; POHLMANN, G.; FARRAR, D.; POHLENZ-MICHEL, C.; TILMANN, T. MANGELSDORF, I. Genotoxicity testing of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) in a mouse bone marrow micronucleus test complemented with hematological endpoints. **Mutation Research**, v. 697, p. 38-46, 2010.

## 7 DISCUSSÃO FINAL

A prática do uso de inseticidas para o controle de pragas agrícolas tem abrangência mundial. Dentre os inseticidas empregados, formulações a base do *Bacillus thuringiensis* ganhou respaldo ao longo destas últimas décadas para o controle biológico de insetos-praga (PIGOTT; ELLAR, 2007). A vantagem na utilização deste bioinseticida sempre foi atrelada ao baixo risco de contaminação ambiental e a humanos, principalmente aos que trabalham diretamente na pulverização, e a rápida biodegradação no ambiente por ações das chuvas e dos raios UV (FEDERICI, 2005). Entretanto, estima-se que a persistência de Bt no solo depende das interações entre as variáveis ambientais como a atividade biótica, o tipo de solo, as condições do ambiente que pode variar de acordo com o local e a sazonalidade, e as práticas de manejo da agricultura, refletindo, assim, a complexidade do ecossistema solo-planta (O'CALLAGHAN *et al.*, 2005).

A forma mais recente na utilização do Bt é o manejo de culturas geneticamente modificadas (BRAVO *et al.*, 2007). O emprego de técnicas moleculares tem permitido a inserção e a expressão de genes *cry* modificados em plantas denominadas de Bt-transgênicas (De MAAGD *et al.*, 1999a). A quantidade de proteínas nos tecidos das plantas está relacionada a dois fatores, ao evento e ao promotor. O evento é a inserção do gene *cry* que codificará a produção da  $\delta$ -endotoxina Bt no material genético da planta para a sua expressão em um determinado tecido, e o promotor informa ao gene onde e quando produzir a proteína Cry. No entanto, é comum a utilização de diferentes promotores e, deste modo, as quantidades expressas das  $\delta$ -endotoxinas Bt são variáveis. Além disso, é difícil controlar o local de inserção do transgene no cromossomo da planta. Consequentemente, a expressão das proteínas Cry não pode ser completamente controlada e acaba ocorrendo em diferentes eventos, sendo não específica a um determinado tecido (CLARK *et al.*, 2005).

Análises de níveis de expressão de  $\delta$ -endotoxinas em diversas partes da planta são necessárias para analisar os efeitos a organismos não-alvo, bem como, avaliar questões relacionadas ao monitoramento de resistência de insetos (O'CALLAGHAN *et al.*, 2005; OECD, 2007). A rota mais simples de exposição às  $\delta$ -endotoxinas de Bt nas plantas transgênicas é através do consumo direto de folhas, caules, raízes, sementes (CLARK *et al.*, 2005, OECD, 2007). Existem dados que mostram que são relativamente baixos os níveis de expressão das  $\delta$ -endotoxinas em partes comestíveis dessas plantas ou no pólen (BETZ *et al.*, 2000; OECD, 2007). Em contrapartida, há relatos de que os níveis de expressão das proteínas de Bt variaram de acordo com o crescimento vegetal. A maior quantidade de proteína ocorreu

na antese, quando a biomassa das plantas é maior. Supõe-se, também, que muitos fatores ambientais afetam a concentração da proteína no vegetal em condições de campo (revisado por CLARK *et al.*, 2005).

Portanto, com a entrada no mercado agrícola de cultivares-Bt houve um aumento da biodisponibilidade destas  $\delta$ -endotoxinas no ambiente (De MAAGD *et al.*, 1999a) e mesmo tendo as proteínas Cry como específicas para insetos ou pequenos invertebrados suscetíveis (OECD, 2007), verificamos que são necessários mais testes de biossegurança para avaliar os efeitos sobre organismos não-alvo simulando diferentes situações de estresse ambiental e formas de exposição (BISHOP *et al.*, 1999; CLARK *et al.*, 2005). Nossos estudos demonstraram que houve toxicidade após exposição de camundongos aos esporos-cristais de Bt Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, sugerindo que eles não são inofensivos a mamíferos.

Através da investigação do hemograma e do teste do micronúcleo é possível avaliar em modelos animais efeitos hematotóxicos, citotóxicos e genotóxicos em decorrência da administração de um xenobiótico (GRISOLIA *et al.*, 2002; ZIEMNAN *et al.*, 2010). Nossos resultados apontaram hematotoxicidade, que variou de acordo com a via de administração e o tipo de esporo-cristal estudado. A via i.p. apresentou-se, como esperado, mais agressiva do que a via oral, mostrando também efeitos genotóxicos que não foram observados na via oral. Entretanto, a administração oral mostrou efeitos citotóxicos, particularmente para a linhagem eritróide, e o teste do micronúcleo corroborou os resultados hematológicos, ao indicar inibição do índice de proliferação celular da medula óssea após os tratamentos com Cry. Além disto, nossos resultados mostraram persistência das Cry no organismo, com efeitos tóxicos mais evidentes no tempo de 7 dias, principalmente para Cry1Ab, que provocou um quadro de anemia microcítica hipocrômica. Até então, não foi relatada a existência de receptores para as proteínas Cry em vertebrados, e consequentemente, para mamíferos (OECD, 2007). Mas nossos dados sugerem a possibilidade das toxinas não terem sido completamente degradadas no estômago e terem sido ativadas pelo pH alcalino intestinal. Também sugerem a possibilidade de haver receptores ainda desconhecidos no intestino de vertebrados com afinidades pelas proteínas Cry ou pelos seus metabólitos.

Por fim, demonstramos que os esporos-cristais Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram hematotóxicos e citotóxicos em ambas as vias, mas a genotoxicidade foi verificada apenas para a via i.p. Portanto, os esporos-cristais em questão não são inócuos a mamíferos e causaram prejuízos às células da medula óssea refletindo também no hemograma. Desta forma, verificamos que os dados obtidos na literatura até o momento para a biossegurança de organismos não-alvo são insuficientes para se afirmar que produtos de Bt

são seguros. Levando-se em consideração a exposição contínua de humanos e animais (particularmente os domésticos) em níveis consideráveis de Bt através da dieta, nossos resultados sugerem que são necessários protocolos mais eficientes de avaliação, com exposição mais longa dos mamíferos a estas dietas, e envolvendo observações clínicas antes de concluir que os transgênicos Bt são seguros para a alimentação. Protocolos mais severos verificando-se diferentes *endpoints* também precisam ser utilizados para se atestar com eficácia à segurança de organismo não-alvo e do meio ambiente.

## 8 CONCLUSÃO

Considerando-se os objetivos gerais, conclui-se que:

- Na via oral, os esporos-cristais Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram hematotóxicos e citotóxicos para a medula óssea, tanto em doses simples quanto em combinações binárias, não apresentando efeito genotóxico.
- A dose mais alta foi a mais tóxica; entretanto para a maioria dos parâmetros analisados, não houve uma relação direta de dose-efeito nas comparações dos esporos-cristais em diferentes concentrações.
- Cada esporo-cristal tem propriedades inerentes, comportando-se de forma distinta quando administrados isoladamente ou em combinações. Os efeitos tóxicos e citotóxicos variaram de acordo com cada um deles para determinados parâmetros.
- O tempo prolongado de 7 dias após uma única administração via oral causou alterações significativas nos padrões hematológicos, sugerindo, portanto, que os esporos-cristais não foram completamente degradados no estômago e continuaram a interagir com o organismo do camundongo. Cry1Ab provocou efeitos mais severos, conduzindo a um quadro de anemia microcítica hipocrômica.
- A via de administração intraperitoneal foi a mais severa para a linhagem leucocitária e para a medula óssea quando a quando comparada à administração via oral. Nesta via, o esporo-cristal Cry1Ac foi o mais tóxico, provocando 100% de mortalidade na dose intermediária.
- Por fim, nossos resultados sugerem que os esporos-cristais deste estudo não são inócuos a mamíferos e provocaram alterações significativas tanto nos padrões hematológicos quanto na medula óssea de camundongos.

## 9 PERSPECTIVAS

Nossos resultados demonstraram que as  $\delta$ -endotoxinas apresentam toxicidades e genotoxicidades características para cada uma delas. Assim, as próximas abordagens para verificar os riscos destas toxinas em biopesticidas e em plantas transgênicas para a avaliação de biossegurança, devem levar em consideração tais diferenças. Recomenda-se que para estudos de biossegurança os ensaios sejam conduzidos para avaliar individualmente cada uma delas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA -AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução-RDC nº 194, de 8 de julho de 2002. Regulamentação de Produtos Microbiológicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 jul. 2002. Seção 1, p. 228-229. Disponível em < <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/232301/dou-secao-3-11-07-2002-pg-228>> acesso em 24 set. de 2010.

ARMSTRONG, J. L.; ROHRMANN, G. F.; BEAUDREAU, G. S. Delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 161, n. 1, p. 39-46, 1985.

ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PERFEROEN, M.; GÜERECÁ, L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuide). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p. 203-212, 1996.

ARJUNAN, S.; QAIM, M. Village-wide effects of Agricultural Biotechnology: the case of Bt Cotton in India. **Word Development**, v.37, n. 1, p. 256-267, 2009.

ARONSON, A. L., BECKMAN W., DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, v. 50, p. 1-24, 1986.

BARROS, R.; DEGRANDE, P. E.; RIBEIRO, J. F.; RODRIGUES, A. L. L.; NOGUEIRA, R. F., FERNANDES, M. G. Flutuação populacional de insetos predadores associados a pragas do algodoeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 57- 64, 2006.

BEAMONTE, A.; GOLDFAIN-BLANC, F.; CASADEVALL, N.; BAZOT, D.; BERTHEUX, H.; CLAUDE, N. A case of drug-induced hematotoxicity: from *in vivo* to *in vitro* assessment. **Comparative Clinical Pathology**, v. 14, p. 61-65, 2005.

BETZ, S. F.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 156-173, 2000.

BHATTACHARYA, P. R. *Bacillus thuringiensis* crystal protein ( $\delta$ -endotoxin) gene expression is independent of early sporulation specific functions. **Journal of Biosciences**, v. 18, n. 2, p. 221-228, 1993.

BISHOP, A. H.; JOHNSON, C.; PERANI, M. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 375-380, 1999.

BOBROWSKI, V. L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from South Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 25, p. 129-135, 2002.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos plantas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 843-850, p. 843-850, 2003.

BRASIL, DECRETO N° 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002, que regulamente a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 que dispõe sobre o uso de agrotóxicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 Jan. 2002. Seção 1, p. 1-12. Disponível em <<http://www.jusbrasil.com.br/legislacao/110539/decreto-4074-02>> acesso em 24 set. de 2010.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Conjunta nº 3 de 10 de março de 2006, que estabelece procedimentos adotados junto ao MAPA, à ANVISA e ao IBAMA, para estabelecer procedimentos a serem adotados para efeito de registro de agentes microbiológicos, empregados no controle de uma população ou de atividades biológicas de um outro organismo vivo considerado nocivo. **Diário Oficial da União**, DF, 15 mar. 2006, Seção 1, p. 23. Disponível em <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/497045/dou-secao-1-15-03-2006-pg-23>> acesso em 25 set. 2010.

BRAVO, A.; SÁNCHEZ, J.; KOUSKOURA, T.; CRICKMORE, N. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 23985-23987, 2002.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In **Comprehensive Molecular Insect Science**. GILBERT, L. I.; KOSTAS, I.; GILL, S. S.; (eds), Elsevier, v. 6, p. 175-206, 2005.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, 2007.

CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J. Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1676-1683, 2005.

CLARCK, B. W.; PHILIPS, T. A.; COATS, J. R. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4643-4653, 2005.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; RIE, J. V.; 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, n. 3, 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**. Disponível em: <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/)> acesso em 23 set. 2010.

DAMGAARD, P. H.; GRANUM, P. E.; BRESCIANI, J.; TORREGROSSA, M. V.; *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 18, p. 47-53, 1997.

De BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains. **Entomophaga**, v. 35, p. 233–240, 1990.

De BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains. **Entomophaga**, v. 35, p. 233–240, 1990.

De MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 1, p. 9-13, 1999a.

De MAAGD, R. A. b; BAKKER, P. L.; MASSON, L.; ADANG, M. J.; SANGADALA, S.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 463-471, 1999b.

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, n. 4, p. 193-199, 2001.

De MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming entomopathogenic Bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 409-433, 2003.

DIAS, J. M. C. S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.59-76, 1992. Edição especial.

DU, C.; NICKERSON, K. W. *Bacillus thuringiensis* HD73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3722-3726, 1996.

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.

DOUVILLE, M., GAGNÉ, F., ANDRE, C. Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and transgenic Bt corn Cry1Ab gene from an aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p.195-203, 2007.

ESTRUCH, J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W., KOZIEL, M. G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 137-141, 1997.

EVERDS, E. Hematology of the laboratory mouse. In: FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISON, M. T.; NEWCOMER, C. E.; QUIMBY, F. W.; SMITH, A. L. **The mouse in Biomedical research – Normative Biology, Husbandry, and Models**. California: Academic Press, v. 3, 2 ed., p. 133-170, 2006.

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; *et al.* The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 34, p. 1118-1120, 1969.

FAUST, R. M.; BULLA, L. A. Bacteria and their toxins as insecticides, p. 75-208, 1982. In E. Kurstak, **Microbial and viral pesticides**.

FEDERICI, B. A. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, p. 30-38, 2005.

FERRÉ, JUAN; VAN RIE, J. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 501-533, 2002.

FINAMORE, A.; ROSELLI, M.; BRITTI, S.; MONASTRA, G.; AMBRA, R.; TURRINI, A.; MENGHERI, E. Intestinal and peripheral immune response to MON810 Maize ingestion in weaning and old mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11533-11539, 2008.

FISCHHOFF, D. A. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biotechnology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

FONTES, 1998. Biossegurança de biotecnologias: breve histórico. In CAVALLI, S. B. Segurança alimentar: abordagem dos alimentos transgênicos. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 41-46, 2001.

GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, E. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 147-163, 2009.

GLARE, R. T.; O'CALLAGHAN, M. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Report for the Ministry of Health. **Biocontrol & Biodiversity**, p. 1-58, 1998.

GILL, S. S.; COWLES, A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 615-636, 1992.

GÓMEZ, I.; ARENAS, I.; BENITEZ, I.; MIRANDA-RÍOZ, J.; BECERRIL, B.; *et al.* Specific Epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the Sequential Interaction with Cadherin and Aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34032-34039, 2006.

GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L. E., *et al.* Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, v. 28, n. 1, p. 169-173, 2007.

GONÇALVES, L.; ESPINDOLA, C. B.; ALMEIDA, F. S. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Bacillaceae): potencial no controle, no desenvolvimento e reprodução de *Oxydia vesulia* (Geometridae), em laboratório. **Acta Biológica Paranaense**, v. 37, p. 147-163, 2008.

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 e reprodução**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, p. 1-392, 2005.

GRISOLIA, C. K.; OLIVEIRA, R.; DOMINGUES, I.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G.; SOARES, A. M. Genotoxic evaluation of different delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. **Mutation Research**, v. 672, n. 2, p. 119-123, 2009.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* in: **Entomopath. Bact.: from laboratory to field application** (Chales, J. *et al.*, eds), Kluwer Academic Publishers, p. 41-44, 2000.

GRIFFITTS, J. S.; AROIAN, R. V. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. **BioEssays**, v. 27, p. 614-624, 2005.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Biochemistry**, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.

HORI, H.; KUMARASWAMI, N. S.; HAYAKAWA, T.; MITSUI, T. *Bacillus thuringiensis* specific to *Scarabaid* beetles: A Review. **Entomologia Sinica**, v. 7, n. 4, p. 359-387, 2000.

HUANG, J.; HU, R.; PRAY, C.; QIAO, F.; ROZELLE, S. Biotechnology as an alternative to chemical pesticides: a case study of Bt cotton in China. **Agricultural Economics**, v. 29, p. 55-67, 2003.

ICOZ, I. STOTZKY, G. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 559-586, 2008.

JAOUA, S.; ZOUARI, N.; TOUNSI, S.; ELLOUZ, R. Study of the  $\delta$ -endotoxins produced by three recently isolated strains of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 349-354, 1996.

KARIM, S.; RIAZUDDIN, S.; GOULD, F.; DEAN, D. H. Determination of Receptor Binding Properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxins to Cotton Bollworm (*Helicoverpa zea*) and Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) Midgut Brush Border Membrane Vesicles. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 67, p. 198-216, 2000.

KLETER, A. G.; BHULA, R.; BODNARUK, K.; CARAZO, E.; FELSOT, A. S. *et al.* Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. **Pest Management Science**, v.39, p.159-162, 2007.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Advances in insect Physiology**, v. 24, p. 275-308, 1994.

KOTZE, A. C.; O'GRADY, J.; GOUGH, J. M.; *et al.* Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal of Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 1013-1022, 2005.

KRIEG, A.; HUGER, A.; LANGENBRUCH, G.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. A new pathotype effective against larvae of Coleoptera. **Journal of Applied Entomology**, v. 96, p. 500-508, 1983.

KRYWUNCZYK, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, p. 139-140, 1980.

LEVINSON, B. L.; KASYAN, K. J.; CHIU, S. S.; CURRIER, S.; GONZALEZ JR.; J. M. Identification of  $\beta$ -exotoxin production, plasmids encoding  $\beta$ -exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 3172-3179, 1990.

LI, J.; DERBYSHIRE, D. J.; PROMDONKOY, B.; ELLAR, D. J. Structural implications for the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, pt. 4, p. 571-577, 2001.

LOGUERCIO, L. L.; BARRETO, M. L.; ROCHA, T. L.; SANTOS, C. G.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for *Vip*-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 269-277, 2002.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., p. 710, 2006.

MONNERAT, R.; Masson, L.; BROUSSEAU, R.; CAREY, M. P.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, v. 39, p. 159-162, 1999.

MONNERAT, R. G.; BORDAT, D.; CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H. Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e Inseticidas Químicos Sobre a Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera:Yponomeutidae) e Seus Parasitóides. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 4, p. 723-730, 2000a.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. **Controle Biológico**, v. 3, p. 163-200, 2000b.

MONTEIRO, L. B.; SOUZA, A. Controle de tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *Kustaki* em Fraiburgo-SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 423-428, 2010.

NAIR, M. S.; DEAN, D. H. All Domains of Cry1A Toxins insert to insect Brush Border Membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26324-26331, 2008.

OECD, 1986. Safety considerations for industrial, agricultural and environmental applications of organisms derived by recombinant DNA techniques. **Recombinant DNA safety Considerations**. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), p.1-74, 1986.

OECD, 1992. Safety considerations for Biotechnology. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), p.1-45, 1992.

OECD, 2007. Consensus Document on Safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* – derived insect control proteins. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), p.1-109, 2007.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E. P. J.; MALONE, L. A. Effects of Plants Genetically Modified for insect resistance on Nontarget Organisms. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 271-292, 2005.

PARDO-LÓPEZ, L.; GÓMEZ, I.; RAUSELL, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBÉRON, M.; BRAVO, A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from bacillus thuringiensis induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. **Biochemistry**, v. 45, p. 10329-10336, 2006.

PARK, H.; KIM, H.; LEE, D.; YU, Y.; JIN, B.; KANG, S. Expression and synergistic effect of three types of crystal protein genes in *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical and Biophysical Research communications**, v. 214, n. 2, p. 602-606, 1995.

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 88, p. 91-142, 2005.

PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, p. 159-168, 2008.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; *et al.* Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n.1, p. 11-16, 2004.

PRAÇA, L. B.; SOARES, E. M.; MELATTI, V. M.; MONNERAT, R. G. *Bacillus thuringiensis* BERLINER (Eubacteriales: Bacillaceae): Aspectos gerais, modo de ação e utilização. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, n. 239, p. 1-40, 2007.

RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M. de. Levantamento de insetos predadores nos cultivares de algodão Bollgard DP90 e Convencional Delta Pine Acala 90. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 119- 121, 2006.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R. Novel Vip3 related protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6276- 6281, 2005.

REDDY, S. T.; KUMAR, N. S.; VENKATESWERLU, G. Comparative analysis of intracellular proteases in sporulates *Bacillus thuringiensis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 279-281, 1998.

REN, Z.; MA E.; GUO, Y. Chromosome aberration assays for the study of cyclophosphamide and *Bacillus thuringiensis* in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae). **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 520, p. 14-150, 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. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA p. 173-178, 2003.

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOUE, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of  $\delta$ -endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 393-404, 1998.

SAYYED, A. H.; GATSI, R.; IBIZA-PALACIOS, M. S., ESCRICHE, B.; WRIGHT D. J.; CRICKMORE, N. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6863-6869, 2005.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 775-806, 1998.

SÉRALINI, G. E.; CELLIER, D.; De VENDOMOIS, J. S. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 4, p. 596-602, 2007.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I., GÓMEZ, I., TABASHNIK, B.E.; BRAVO, A. Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. **Science**, v. 318, p. 1640-1642, 2007.

TABASHNIK, B. E. Evolution of Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 47-79, 1994.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S., *et al.* Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1211-1217, 1992.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **Journal of Cell Science**, v. 60, p. 181-197, 1983.

TOJO, A.; AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombix mori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 576-580, 1983.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSSENS, S.; De BEUKELLER, M. *et al.* Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, p. 33-37, 1987.

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush

border membrane of the midgut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, V. 186, P. 239-247, 1989.

VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I.; MORENO-FIERROS, L.; NERI-BAZÁN, L.; DE LA RIVA, G. A.; LÓPEZ-REVILLA, R. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody response in mice. **Life Sciences**, v. 64, p. 1897-1912, 1999.

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.

YAMAMOTO, TAKASHI. Identification of Entomological Toxins of *Bacillus thuringiensis* by high Performance Liquid chromatography. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 2595-2603, 1983.

YU, C-G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 532-536, 1997.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; TAUSSIG, R.; BULLA Jr.; L. A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **PNAS**, v. 103, n. 26, 2006.

ZHONG, C.; ELLAR, D. J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S.; HART, E. R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin which is toxic to insects in three Orders. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, p. 131-139, 2000.

ZIEMANN, C.; HANSEN, T.; POHLMANN, G.; FARRAR, D.; POHLENZ-MICHEL, C.; TILMANN, T. MANGELSDORF, I. Genotoxicity testing of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) in a mouse bone marrow micronucleus test complemented with hematological endpoints. **Mutation Research**, v. 697, p. 38-46, 2010.

## ANEXO

**Universidade de Brasília**Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 25 de maio de 2009.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado “**Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade das toxinas Bt originárias do *Bacillus thuringiensis***”, UnBDOC nº 32942/2009, sob responsabilidade do Prof. Cesar Koppe Grisolia, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben  
Coordenador do CEUA