

Universidade de Brasília - UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA
ALIMENTAR DAS TOXINAS Cry1Ia12 E
Cry8Ha1 EM MAMÍFEROS**

Luciane Mourão Guimarães
Brasília, 29 de abril de 2008

Universidade de Brasília - UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA
ALIMENTAR DAS TOXINAS Cry1Ia12 E
Cry8Ha1 EM MAMÍFEROS.**

Luciane Mourão Guimarães 06/53071

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

ORIENTADORA
Dra. Maria Fátima Grossi de Sá
CO-ORIENTADORA
Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Universidade de Brasília - UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Luciane Mourão Guimarães 06/53071

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá
Orientadora

Dr. Thales da Rocha Lima

Prof. Dra. Laila Salmen Espíndola

Brasília, 2008

A minha mãe, **Teresinha Mourão**, pelo seu amor, apoio constante e auxílio possibilitando o meu crescimento acadêmico. Não somente isso, mas por me ensinar o todo instante com seu infinito amor, que ser “gente grande” é abraçar, se entregar, sonhar, recomeçar tudo de novo. E, acima de tudo, é ter um caso de amor com a própria existência e desvendar seus mistérios.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **EMBRAPA**, pela oportunidade de realizar este projeto em sua estrutura física e compartilhando a vivência com seus pesquisadores.

À **Universidade de Brasília – UnB**.

Ao **Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular** da Faculdade de Medicina - UnB.

À **Universidade Federal do Ceará – UFC**.

Ao **Laboratório de Toxina Vegetal – UFC**.

Às fontes financiadoras, **EMBRAPA, CAPES, FACUAL e CNPq**, pelo apoio Financeiro.

“O pior cárcere não é o que aprisiona o corpo,
mas o que asfixia a mente e algema o coração.
Sem liberdade, as mulheres sufocam seu prazer.
Sem sabedoria, os homens se tornam máquinas de trabalhar.
Ser livre é não ser escravo das culpas do passado
nem das preocupações do amanhã.
Ser livre é ter tempo para as coisas que ama.
É abraçar, se entregar, sonhar, recomeçar tudo de novo.
É desenvolver a arte de pensar e proteger a emoção.
Mas, acima de tudo, ser livre é ter
Um caso de amor com a própria existência
E desvendar seus mistérios.”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, orientadora dessa dissertação, por me ensinar o “caminho das pedras” com muito carinho, por ter me oferecido a oportunidade de fazer parte da equipe do seu laboratório, acreditando em mim e no meu trabalho. Seu apoio ao meu ingresso no mestrado, suas observações e sugestões, foram fundamentais para o meu aprendizado.

Agradeço à Dra. Ilka Vasconcelos, co-orientadora dessa dissertação, por me ensinar o com muito carinho, competência, amizade e paciência ao longo dos 4 meses que tive em Fortaleza. Fique certo de que adorei cada momento dessa jornada aprendi muito com você e que sempre vou lembrar-me da sua ajuda!

À Dra. Liziane Lima, por, juntamente com o Rodrigo, ter me ensinado com muita paciência, carinho e amizade os primeiros passos científicos.

Ao Dr Rodrigo Fragoso, o meu eterno co-orientador, por ter me ensinado os primeiros passos científicos, sem nunca ter deixado de me acompanhar na minha pequena trajetória científica. E agradeço principalmente sua amizade e seu Carinho.

As minhas grandes e eternas amigas; Isabela “Má”, Poliene “Espartana” e Raquel “Sid”, por suas amizades, carinhos e ajudas em todos os momentos, desde as mais maravilhosas cachaçadas até nos momentos mais difíceis.

À Relinda pela sua amizade e competência, que foram importantíssimos na longa batalha de expressão e purificação das proteínas Cry.

À Mariana pelas suas observações e ensinamentos valiosíssimos, que me ajudaram no amadurecimento durante todo o período do mestrado.

Ao meu amigo, competentíssimo, Davi, pela sua enorme compreensão e amizade, me ajudando em todos os momentos que eu estava em Fortaleza.

À prof Ana de Fátima por ter me recebido tão bem em seu laboratório, sempre me ajudando e me intuído com ótimas idéias.

Aos meus amigos do laboratório, Firmino, PH, Martônio, Janne, Adelina, Lecir, Ivaldo, Sineide e Rafa por ajudarem minha vida no laboratório, ficar ainda mais legal.

Ao Dr Thales, Osmundo e Simoni, pelos ótimos conselhos tanto profissional como pessoal.

Aos meus colegas de laboratório, pela companhia, risadas, sugestões e “ensinamentos” durante todo o meu período de laboratório.

Ao pessoal do Labtox e da fisiologia animal por tornarem minha estadia em fortaleza mais prazerosa.

Aos meus Tios e primos de Fortaleza, que me receberam muito bem.

À minhas amigas “Sex and City”, Ligia, Delaine e Luciana, pela a grande e duradoura amizade, por sempre estarem comigo nas mais loucas e engraçadas aventuras, pelos conselhos, e pelo apoio e amizade nos momentos mais difíceis da minha vida.

A todos que, de alguma forma, me ajudaram e contribuíram para que eu atingisse mais essa etapa, agradeço;

À minha irmã Renata, a minha sobrinha e ao meu cunhado, que apesar da distância, estiveram sempre presentes dando apoio e estímulo para que eu continuasse minha caminhada;

Ao meu pai, Fernanda e Mateus, por todo seu amor e por sempre acreditarem em mim.
À minha Família eu rendo os meus mais sinceros agradecimentos.

E por último, mas nunca o último, agradeço a Deus por ter guiado meu caminho por linhas bem tortas que me fez aprender que nunca devo parar de confiar em Ti.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1.0 INTRODUÇÃO	01
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Plantas Geneticamente Modificadas	03
2.1.1 O Cultivo do Algodão Bt.	04
2.1.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	07
2.1.3 δ -endotoxinas	08
2.1.4 Mecanismo de Ação das Proteínas Cry	09
2.1.5 Desenvolvimento de Plantas Geneticamente Modificadas	11
2.2 Desenvolvimento do Protocolo de Biossegurança	11
2.3 Biossegurança de Transgênicos	13
2.3.1 O Conceito de Equivalência Substancial (ES)	14
2.3.2 Avaliação de Segurança do Material Geneticamente Induzido	15
2.3.3 Avaliação de Segurança da Proteína Expressa pelo Gene Inserido	16
2.3.4 Toxicidade	16
2.3.5 Potencial Alergênico	18
2.3.6 Avaliação de Segurança na Composição do Alimento	19
3.0 JUSTIFICATIVA	21
4.0 OBJETIVOS	22
4.1 Objetivos Gerais	22

4.2	Objetivos Específicos	22
5.0	METODOLOGIA	23
5.1	Obtenção das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1	23
5.1.1	Construção dos Vetores de Expressão Contendo o Gene <i>cry1Ia12</i> e <i>cry8Ha1</i>	23
5.1.2	Expressão dos Genes <i>cry1Ia12</i> e <i>cry8Ha1</i> em <i>Escherichia coli</i> .	24
5.1.3	Purificação das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1	25
5.1.4	Determinação das Proteínas	25
5.1.5	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	25
5.2	Ensaio Biológico	26
5.2.1	Avaliação dos Efeitos Sub-crônicos das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 por Via Oral	26
5.2.2	Análises Histológicas	31
5.2.3	Bioquímica Sanguínea	32
5.2.4	Avaliação da Toxicidade Aguda das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 por Via Oral	33
6.0	RESULTADOS	34
6.1	Obtenção das Toxinas Recombinante Cry1Ia12 e Cry8Ha1	34
6.1.1	Construção dos Vetores de Expressão Contendo o Gene <i>cry1Ia12</i> e <i>cry8Ha1</i>	34
6.1.2	Expressão dos Genes <i>cry1Ia12</i> em <i>Escherichia coli</i> .	37
6.1.3	Expressão dos Genes <i>cry8Ha1</i> em <i>Escherichia coli</i> .	38
6.1.4	Purificação das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1	39
6.2	Avaliação dos Efeitos Sub-crônicos das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 por Via Oral	40
6.2.1	Crescimento dos Animais	40
6.2.2	Ganho de Peso, Dieta Ingerida e Conversão Alimentar	42
6.2.3	Balanço Nitrogenado	46
6.2.4	Avaliação dos Órgãos Internos dos Ratos	50
6.2.5	Análises Histológicas	52
6.2.6	Bioquímica Sanguínea	54

6.3 Avaliação da Toxicidade Aguda das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 por Via Oral (dose única)	63
7.0 DISCUSSÃO	64
8.0 CONCLUSÃO	73
9.0 PERSPECTIVA	74
10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Área Global com lavouras GM.	03
Figura 2: Representação esquemática dos fragmentos gênicos e do vetor de expressão	23
Figura 3: Representação esquemática dos vetores de expressão <i>pET101/cryIIa12</i> e <i>pET101/cry8Hal</i>	24
Figura 4: Gaiolas metabólicas	30
Figura 5: Amplificação do gene <i>cryIIa12</i>	35
Figura 6: Amplificação do gene <i>cry8Hal</i>	36
Figura 7: Análise por SDS-PAGE 12% da expressão do gene <i>cryIIa12</i> em sistema heterólogo <i>E. coli</i> .	37
Figura 8: Análise por SDS-PAGE 12% da expressão do gene <i>cry8Hal</i> em sistema heterólogo <i>E. coli</i> .	38
Figura 9: Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante CryIIa12 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA)	39
Figura 10: Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante Cry8Ha1 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA)	40
Figura 11: Curvas de crescimento dos ratos submetidos ao ensaio sub-crônico	41
Figura 12: Comparação do tamanho dos animais submetidos à avaliação do ensaio sub-crônico	44
Figura 13: Gráfico referente à quantidade de dieta ingerida, ganho de peso e conversão alimentar dos animais experimentais	45
Figura 14: Análise dos parâmetros nutricionais dos animais submetidos ao ensaio sub-crônico	49
Figura 15: Cortes de duodeno de ratos alimentados com dietas padrão (à base de clara do ovo) e contendo as Toxinas CryIIa12 e Cry8Ha1 (aumentos de 600X)	53
Figura 16: Concentração (g/dL) de proteínas séricas totais	55
Figura 17: Concentração de albumina sérica (g/dL)	56
Figura 18: Níveis séricos (mg/dL) de uréia	58

Figura 19:	Níveis séricos de fosfatase alcalina (U/mL)	59
Figura 20:	Níveis séricos (U/mL) da alanina aminotransferase (ALT)	61
Figura 21:	Níveis séricos (U/mL) da aspartato aminotransferase (AST)	62

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Lista dos principais tipos de algodão GM comercializados no mundo	06
Tabela 2: Composição das Dietas Controle e Experimentais	28
Tabela 3: Ganho de peso, dieta ingerida e conversão alimentar dos ratos	43
Tabela 4: Balanço de nitrogênio dos ratos	47
Tabela 5: Parâmetros nutricionais	48
Tabela 6: Peso seco relativo dos órgãos internos dos ratos	51

ABREVIACOES

Aa	Aminoácidos
AGM	Alimentos Geneticamente Modificados
Amp	Ampicilina – antibiótico
ATG	Códon de iniciação da transcrição: adenina, timina e guanina.
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C-terminal	Região carboxi terminal de uma proteína
Cm ²	Centímetros quadrados
<i>cry</i>	Corresponde aos genes Bt
Cry	Corresponde as proteínas Bt
CTAB	Hexadecyl trimethyl ammonium bromide
dL	Declmetro
dNTPs	Deoxi-ribonucleotídeos trifosfato
D	Dieta ingerida
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
F	Excreção fecal
FN	Nitrogênio fecal
g	Gramas
G	Unidade de força centrífuga
GM	Geneticamente Modificado
IPTG	Isopropil-beta-D-thiogalactopiranosdeo
Kb	Quilobase 10 ³
KDa	Quilo daltons (1000 Daltons)
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LB-gar	Meio de cultura Luria-Bertani sólido
LB-amp	Meio de cultura Luria-Bertani com 100 µg/mL de ampicilina
LB-amp1	Meio de cultura LB com 200 µg/mL de ampicilina
LB-gar-amp	Meio de cultura LB sólido com 100 µg/mL de ampicilina
M	Molar

μF	MicroFaraday
Mg	Microgramas
μL	Microlitros
mA	Miliampere
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
N	Nitrogênio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramas
NTA	Ácido nitroacético
N-terminal Região	amino-terminal de uma proteína
nM	Nanomolar
OD600	Densidade óptica no comprimento de onda 600 nanômetros
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
Oligos	Oligonucleotídeos
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia do DNA
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TAIL-PCR	Termal assymetric interlaced PCR
TE	Tris-EDTA
U	Unidade
V	Volts
°C	Graus Celsius

RESUMO

Com a aprovação do plantio de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) no Brasil, e com a Lei de Biossegurança/2005, é importante que sejam ampliados e efetivados os estudos toxicológicos de proteínas que são expressas em cultivares transgênicas de interesse econômico, a fim de garantir a sua segurança alimentar para o consumo humano e animal. Os genes *cry*, denominados *cryIIa12* e *cry8Ha1*, isolados pelo nosso grupo de pesquisa, a partir de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis*, estão sendo introduzidos em cultivares de algodão, com o intuito de gerar resistência ao ataque de insetos-praga, reduzindo dessa forma o uso indiscriminado de pesticidas, aumentando a qualidade dos produtos finais. No presente trabalho, as atividades desenvolvidas tiveram como foco a avaliação dos efeitos antinutricionais e/ou tóxicos, em mamíferos (ratos), das toxinas entomotóxica CryIIa12 e Cry8Ha1 em ensaios sub-crônico e agudo. Para isso, foi estabelecido e otimizado um sistema de expressão heteróloga e de purificação dessas entomotoxinas em larga escala. No ensaio sub-crônico, as toxinas CryIIa12 e Cry8Ha1 foram incluídas na dieta dos animais, na proporção de 100 mg/Kg de dieta, representando 0,1% da proteína total, e ofertadas durante 10 dias. Como proteína de referência ou padrão foi utilizada albumina da clara do ovo, por ser de alto valor biológico. Nenhum efeito adverso oriundo do consumo das proteínas teste foi observado nos animais, quando comparados àqueles que receberam a proteína padrão. Os diferentes parâmetros analisados compreenderam taxa de crescimento, ganho de peso, consumo de dieta, eficiência alimentar, balanço nitrogenado, utilização líquida de proteína (NPU), digestibilidade *in vivo*, valor biológico, peso seco relativo de órgãos internos e glândulas anexas, histologia do duodeno e bioquímica sanguínea. No ensaio agudo, as toxinas CryIIa12 e Cry8Ha1 foram administradas aos animais em jejum de 12 horas, com auxílio de uma sonda orogástrica, em dose única, encerrando 12 mg de proteína dissolvida em NaCl 0,15 M, calculada com base na quantidade total de proteína ingerida no experimento sub-crônico. Como controle foi utilizado apenas NaCl 0,15 M. A taxa de mortalidade dos ratos foi zero, não tendo sido detectada qualquer alteração de comportamento. Os resultados obtidos demonstraram a inexistência de efeitos antinutricionais e tóxicos em ratos após a administração das toxinas CryIIa12 e Cry8Ha1, evidenciando a segurança alimentar dessas proteínas e reforçando o seu potencial de utilização no desenvolvimento do algodão GM com resistência a insetos-praga.

ABSTRACT

The approval of Genetically Modified Organisms (OGM) in Brazil as well as the Biosafety Law/2005 demand the enlargement and effectiveness of toxicological analyses of proteins expressed in transgenic cultivars of economical interest. These analyses can guarantee its food security for the human and animal consumption. The *cry* genes, called *cry11a12* and *cry8Ha1* isolated by our research group, from a *Bacillus thuringiensis* ancestry, are currently being introduced in cotton cultivars, aiming the generating of the resistance against insect-pests attack. This strategy will decrease the indiscriminate use of pesticides improving the products quality. The research activities developed in the present work, focused the evaluation of antinutritional and/or toxic effects, of Cry11a12 e Cry8Ha1 entomotoxic in mammals (mice) using sub-chronic and acute bioassays. To accomplish that, an optimized heterologous expression system followed by a large scale step purification was carried out. For the sub-chronic bioassays, a proportion of 100 mg / Kg of the toxins Cry11a12 and Cry8Ha1 were included in the animals' diet representing 0,1% of the total protein. This diet was offered to the mice during 10 days, and egg albumin was used as a protein standard due to its high biological value. No adverse effect was observed in the animals which consumed the test proteins when compared to those that received the control protein. The different analyzed parameters corresponding to growth tax, weight gaining, diet consumption, alimentary efficiency, nitrogen balance, liquid use of protein (NPU), digestion *in vivo*, biological value, relative dry weight of internal organs and enclosed glands, duodenum histology and sanguine biochemistry. In the acute bioassays, the toxins Cry11a12 and Cry8Ha1 were administered in a unique dose, using an orogastric probe to animals in 12 hours fast. These doses contained 12 mg of protein dissolved in NaCl 0,15 M and its calculations were based on the total amount of protein ingested in the sub-chronic experiments. A solution of NaCl 0,15 M was used as a control. The mice mortality rate was zero, and no behavior alteration was detected. According to the results, the toxins Cry11a12 and Cry8Ha1 did not show antinutritional and toxic effects for the mice. Thus, the alimentary biosafety of those proteins reinforce their potential use in the development of cotton GM with resistance against insect-pests.

1 – INTRODUÇÃO

O cultivo de plantas geneticamente modificadas (GM) inseriu o setor agrícola mundial na era da biotecnologia moderna. Segundo o relatório divulgado pelo Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações Agrobiotecnológicas (ISAAA), a área mundial plantada com variedades geneticamente modificadas em 2007 superou a marca de 114 milhões de hectares (JAMES, 2007). O rápido crescimento anual da área global cultivada com plantas GM é devido, principalmente, as características introduzidas, que incluem resistência a insetos-praga, tolerância a herbicidas, dentre outras, permitindo um incremento na produtividade e redução no custo de produção (JAMES, 2002).

O Brasil possui, atualmente, a terceira maior área plantada de transgênicos do mundo (CTNBio, 2008), com o plantio e consumo de eventos GM, que expressam as características de resistência a insetos e tolerância a herbicidas. Entretanto, assim como em outros países, existe uma preocupação em relação às questões de segurança e bioética envolvendo os transgênicos, uma vez que as prováveis conseqüências geradas pelo uso da engenharia genética levantam questionamentos, sobretudo em relação aos potenciais riscos à saúde humana e ao meio ambiente. No que se refere à qualidade e aos fatores de riscos dos alimentos geneticamente modificados para o consumo humano, o grande questionamento baseia-se entre os possíveis efeitos alergênico, toxicológico da proteína expressa codificada pelo gene inserido ou na possível alteração da composição nutricional dos alimentos por intermédio da proteína heteróloga. (ALTIERI e ROSSET, 1999).

Nesse sentido, torna-se fundamental a prática de avaliação sistemática de toxicidade dos alimentos derivados do melhoramento genético. Atualmente, estes são avaliados a partir da equivalência substancial, onde as características moleculares e fenotípicas, assim como a composição da planta e de seus derivados são analisadas e comparadas com a cultivar não transgênica. Uma vez submetidos a rígidos procedimentos analíticos, onde é considerado o potencial alergênico, toxicológico e antinutricional da proteína expressa por um gene inserido na cultivar GM, esses são liberados sem restrição para o consumo humano.

Os genes *cry*, denominados *cryIIa12* (esta seqüência encontra-se depositada no Genbank, número de acesso AY788868) e *cry8Hal* (esta seqüência está sendo submetida a patente), isolados pelo nosso grupo de pesquisa (MAGALHÃES, 2006), a

partir de uma estirpe de *B. thuringiensis* (devido a seus vários mecanismos de virulência específicos e eficazes), estão sendo utilizados no processo de introdução em variedades de algodão, com o intuito de gerar resistência ao ataque de insetos-praga, reduzindo dessa forma o uso indiscriminado de pesticidas, aumentando a qualidade dos produtos finais.

Nesse contexto, as atividades do presente trabalho justifica-se devido à importância na geração de resultados, com foco nos efeitos antinutricionais e/ou tóxicos das toxinas entomotóxicas Cry11a12 e Cry8Ha1 para mamíferos (ratos), em experimentos sub-crônico e agudo. Os resultados obtidos são de relevância na elucidação dos possíveis impactos dessas proteínas em sistemas biológicos, no sentido de contribuir com informações sobre a sua utilização com segurança, fornecendo subsídios nas discussões sobre transgênicos e conferindo ao produto brasileiro qualidade e competitividade.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas Geneticamente Modificadas

O século XX foi marcado por profundas transformações na tecnologia agrônômica, resultantes dos avanços na agricultura de precisão (informações geoposicionadas, satélites e informática) e do melhoramento genético de plantas, associado à biologia molecular, contribuindo para o surgimento da biotecnologia moderna. A rápida evolução da biotecnologia moderna trouxe ilimitadas possibilidades ao melhoramento genético de plantas, além de ter proporcionado uma maior rapidez e agilidade nos programas desenvolvidos, tornando o uso dessa tecnologia, um elemento chave para o aumento da produção de alimentos, face às preocupações ambientais, à limitação de terras cultiváveis e ao crescimento da população.

Durante o ano de 2007 e após 12 anos da utilização da nova tecnologia foram cultivados 114,3 milhões de hectares de variedades geneticamente modificadas (Figura 1). O que Representou um aumento de 12% em relação a 2006, segundo o relatório anual do ISAAA – Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações Agrobiotecnológicas (JAMES, 2007).

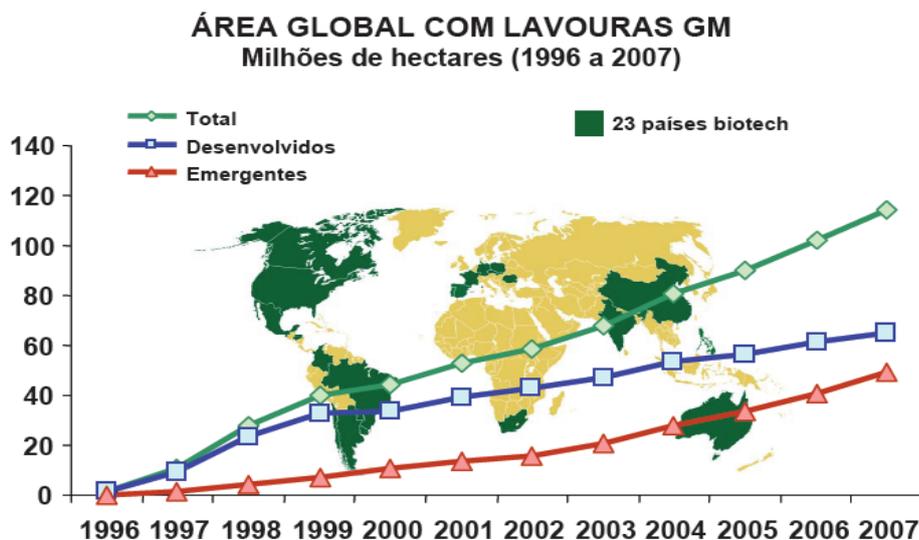


Figura 1. Área Global com Lavouras GM. Aumento de 12% de área plantada com culturas transgênicas, 12,3 milhões de hectares, entre 2006 e 2007. Fontes: James (2007).

Atualmente no mundo 23 países utilizam culturas transgênicas. Dentre eles 12 países em desenvolvimento ultrapassando os 11 países desenvolvidos que usam a agrobiotecnologia. O crescimento entre 2006 e 2007 nos países em desenvolvimento foi de 21% em relação ao período anterior, superando os países desenvolvidos que atingiu um crescimento de apenas 6%.

Dentre as plantas cultivadas geneticamente modificadas (GM), a soja transgênica continua sendo a principal cultura usada pelos agricultores que chega a 57% da área total cultivada. O milho, o algodão e a canola são as outras três culturas mais utilizadas. Essas variedades transgênicas compreendem 25%, 13% e 5%, respectivamente da área plantada. O ISAAA prevê um aumento na área cultivada por variedades transgênicas das culturas citadas e de novas espécies, incluindo o arroz, o trigo e a berinjela.

Dos seis principais países que adotaram a engenharia genética na agricultura, quatro são países em desenvolvimento (Brasil, Argentina, Índia e China). Dentre esses, a Índia teve o maior aumento proporcional em 2007 (63%) e o Brasil o maior crescimento absoluto, atingindo uma área de 15 milhões de hectares. Sendo que 96% dessa área plantada no Brasil foram cultivados com Soja Roundup Ready e 4%, com Algodão Bollgard I. E, com a aprovação de duas variedades de milho transgênico: a Guardian (desenvolvida pela empresa norte-americana Monsanto e resistente a insetos) e a Libertlink (da alemã Bayer e resistente ao herbicida glufosinato de amônio, utilizado na pulverização para combater ervas daninhas), tem capacidade para um crescimento ainda mais vertiginoso (CTNBio, 2008). Para a safra 2008/2009, o Brasil pode igualar-se, ou mesmo superar, a Argentina, ocupando o segundo lugar em área de plantas geneticamente modificadas (JAMES, 2007).

2.1.1. O cultivo do Algodão Bt

Apesar da soja GM se destacar como a principal cultura transgênica, o algodão Bt, algodão geneticamente modificado contendo um gene proveniente da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), foi muito usado entre os pequenos agricultores que se encontram principalmente em países em desenvolvimento, como exemplos China,

Índia, África do Sul, assumindo um papel importante em 2007 com implicações humanitárias, beneficiando aqueles com recursos escassos.

Na Índia, o uso do algodão Bt aumentou seu rendimento em 50% e reduziu aplicações de pesticidas pela metade. Com isso, a Índia ultrapassou os Estados Unidos e se tornou o segundo maior produtor de algodão na safra de 2006/07. Após a adoção da variedade transgênica, que possui uma área estimada em 6,33 milhões de hectares ou 66% da área total de algodão em 2007/08, passando dos 3,69 milhões de hectares de 2006/07 de acordo com o Cotton Advisory Board (2008).

Na China, em média a nível agrícola o algodão Bt aumentou o rendimento em 9,6% e reduziu o uso de pesticidas em 60%, já na África do Sul o algodão Bt reduziu as aplicações de pesticida de dez vezes por estação com algodão não-Bt para duas vezes com algodão Bt. Como consequência da redução do uso de inseticidas houve uma diminuição na exposição dos agricultores aos agrotóxicos o que resultou em um número menor de agricultores intoxicados. O meio ambiente também se beneficia com a redução maciça de defensivos agrícolas. Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), o uso do algodão GM tem demonstrado um forte impacto ambiental positivo resultando em redução significativa da contaminação de fontes de água e menor impacto a insetos benéficos (FAO, 2004).

Até o momento dos 18 tipos de algodão GM que receberam aprovação regulatória em pelo menos um país, alguns deles são resistentes a insetos, mas a grande maioria expressam, genes derivados de *B. thuringiensis* (Tabela 1) (JAMES, 2004; JAMES, 2005; JAMES, 2006; AGBIOS GM DATABASE, 2008).

Tabela 1. Principais tipos de algodão GM comercializados no mundo (AGBIOS GM DATABASE, 2008)

Evento	Gene	Característica	Companhia	Ano comercialização
BXN	<i>Bxn</i>	Tolerância a herbicida	Calgene Inc.	1994
Bollgard®	<i>CryIAc</i>	Resistência a insetos	Monsanto	1996
RoundUp Ready®	<i>CP4 epsps</i>	Tolerância a herbicida (fase vegetativa)	Monsanto	1996
19-51 ^a	<i>ALS</i>	Tolerância a herbicida	DuPont Canadá Agricultural Products	1996
<i>BtCpTi</i> cotton	<i>cryIAc/cryIAb</i> + <i>cpti</i>	Resistência a insetos	Setor Público da China	1997
31807/31808	<i>CryIAc</i> + <i>bxn</i>	Resistência a insetos; tolerância a herbicida	Calgene Inc.	1998
Bollgard II®	<i>cryIAc</i> <i>cry2Ab</i>	+ Resistência a insetos	Monsanto	2003
VipCot	<i>Vip3A</i>	Resistência a insetos	Syngenta	2004
281-24-236	<i>CryIF</i>	Resistência a insetos	Dow AgroSciences LLC	2004
3006-210-23	<i>CryIAc</i>	Resistência a insetos	Dow AgroSciences LLC	2004
LL Cotton 25	<i>Bar</i>	Tolerância a herbicida	Bayer CropScience	2004
WideStrike™	<i>CryIAc</i> + <i>cryIF</i>	Resistência a insetos	Dow AgroSciences	2005
RoundUp Ready® Flex	<i>CP4 epsps</i>	Tolerância a herbicida	Monsanto	2005
LibertyLink	<i>Bar</i>	Tolerância a herbicida	Bayer CropScience	2005
COT 102	<i>Vip3A</i>	Resistência a insetos	Syngenta Seeds, Inc.	2005
LL Cotton 25 x MON15985	<i>bar</i> + <i>cryIAc</i> + <i>cry2Ab</i>	Resistência a insetos e tolerância a herbicida	Bayer CropScience	2007

Atualmente, no Brasil, apenas uma espécie de algodoeiro transgênico está liberada para o plantio em escala comercial. Ele é denominado Bollgard Evento 531 e é conhecido como Bollgard I. Esta variedade apresenta resistência a pragas da Ordem Lepidoptera que afetam a produção do algodão no Brasil, como o curuquerê-do-algodão (*Alabama argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*). Porém é pouco eficaz com relação à *Spodoptera* sp. e ao *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro). Espera-se que o uso de cultivares Bollgard possibilite a redução de inseticidas, mesmo sabendo que não será de uma forma drástica devido ao número de aplicações que ainda são necessárias.

Dessa forma, outros genes de resistência, incluindo outras toxinas Bt e seus variantes, por meio do uso de técnicas de evolução molecular *in vitro* vêm sendo estudados pela Embrapa em associação com o setor produtivo. O objetivo é lutar contra as principais pragas que afetam o algodão no país, incluindo o bicudo-do-algodoeiro. Esta tecnologia quando estabelecida possivelmente permitirá uma significativa redução de custos e o aumento da competitividade da cotonicultura nacional (GROSSI-DE-SÁ e GIBAND, 2006).

2.1.2. Bacillus thuringiensis

B. thuringiensis é uma bactéria de solo, anaeróbica facultativa, Gram-positiva, flagelada, esporulante, caracterizada por sua forma de bastão e pela presença de inclusões cristalinas protéicas (ICP ou Cry Proteins) (BENINTENDE e MARQUEZ, 1996). Essa bactéria é sistematicamente classificada como:

Classe: Firmibacteria

Ordem: Eubacteriales

Família: Bacilaceae

Gênero: *Bacillus*

Espécie: *Bacillus thuringiensis*

Esse microrganismo tem sido amplamente utilizado no mundo inteiro como bioinseticidas e, mais recentemente, vem sendo empregado como uma nova ferramenta para o controle de insetos-praga, por meio da introdução de genes que expressam proteínas entomotóxicas em plantas transgênicas (BETZ *et al.*, 2000;

CHATTOPADHYAY *et al.*, 2004). Hoje muitas espécies de plantas, tem sido geneticamente modificadas com os genes *cry* resultando no desenvolvimento de plantas transgênicas resistente a insetos pragas (CHRISTOU *et al.*, 2006). Inúmeras considerações são feitas em relação ao desenvolvimento de produtos à base de *B. thuringiensis*, pois ao contrário dos inseticidas químicos, eles não deixam resíduos no ambiente.

No mundo inteiro, diversas estirpes de Bt foram isoladas e, atualmente, muitos laboratórios continuam buscando outras novas. Existem várias coleções espalhadas pelo mundo e é estimado que existam 40.000 estirpes. Entre essas, há as que são eficazes contra diversas ordens de insetos (lepidópteros, dípteros e coleópteros) e as que são efetivas frente a outros grupos de invertebrados como nematóides e himenópteras (PIGOTT e ELLAR, 2007).

A atividade entomopatogênica do microorganismo é devida à presença de uma inclusão protéica cristalina, produzida durante a fase de esporulação. Esse cristal protéico é composto por proteínas denominadas de delta-endotoxinas ou proteínas cristal (Cry). Vários fatores de virulência podem ser produzidos pelo Bt, além das proteínas cristal, incluindo proteínas tóxicas com atividade inseticida como a α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HANSEN e SALAMITOU, 2000). Por outro lado, o esporo também pode contribuir para a patogenicidade através de sinergismo com as proteínas cristal (JOHNSON *et al.*, 1998). A rigor, todos esses fatores podem atuar em sinergismo, mas a exata contribuição de cada um deles ainda não é, totalmente, conhecida.

2.1.3. δ -endotoxinas ou Proteínas Cristal (Cry)

As δ -endotoxinas formam atualmente uma família de 110 proteínas, classificados em 40 grupos. Essas proteínas apresentam massa molecular variando de 65 a 138 kDa. Existem mais de 300 diferentes genes *cry*, classificados em diferentes grupos. A classificação das proteínas Cry é baseada na similaridade das seqüências de aminoácidos (CRICKMORE *et al.*, 1998; BEARD *et al.*, 2001).

O processo de formação do cristal está ligado ao segundo estágio da esporulação, sendo liberado quando as células são lisadas. Esses cristais são produzidos sob a forma de protoxinas, transformadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto, pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A toxina ativada causa a lise das células epiteliais e a morte do inseto susceptível (ARONSON *et al.*, 1986). Sendo assim classificadas de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com sua atividade tóxica específica a classe de insetos susceptíveis.

As toxinas contra os insetos da ordem lepidóptera são representados pelas proteínas Cry1, Cry2 e Cry15, no entanto as toxinas podem ser subdividas, como por exemplo, a toxina do tipo Cry1 que têm 36 subgrupos representados por Cry1Aa,..., Cry1Ka (CRICKMORE *et al.*, 1998). Algumas dessas toxinas pertencentes ao grupo Cry1 podem apresentar atividade dupla contra lepidópteros e dípteros e contra lepidópteros e coleópteros, como é o caso das proteínas Cry1Ca e Cry1I, respectivamente (BRADLEY *et al.*, 1995; SASAKI *et al.*, 1996).

As toxinas contra a ordem coleópteras são representadas pela as toxinas Cry3, Cry7 e Cry8. Já as toxinas Cry4, Cry10, Cry11, Cry19 e Cry20 possuem atividade contra os dípteros e as demais toxinas apresentam atividade contra nematóide, hemípteros e ácaros (HOFTE e WHITELEY, 1989).

Das diversas classes de toxinas Cry, as toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 provenientes do *Bacillus thuringiensis* S811 possuem atividade contra o *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), principal praga do algodoeiro brasileiro. (MAGALHÃES, 2006; GROSSI DE SÁ *et al.*, 2007).

2.1.4. Mecanismo de Ação das Proteínas Cry

Os sintomas observados, a partir do momento em que as larvas dos insetos susceptíveis ingerem os cristais e esporos são: parada alimentar, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e morte (ARONSON *et al.*, 1986). O mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo que pode ser dividido em etapas. A 1ª etapa ocorre pela solubilização dos cristais no intestino dos insetos, devido ao pH extremamente alcalino, expondo as toxinas que o compõem. Essas toxinas em solução são ativadas por proteases existentes no intestino médio dos insetos, causando a perda das porções N-

terminal e C-terminal da protoxina, liberando um monômero de aproximadamente 60-70 kDa, conhecido como fragmento tóxico (GROCHULSKI *et al.*, 1995). O monômero liga-se a receptores específicos presentes na região apical da membrana de células do intestino médio do inseto (HOFMANN *et al.*, 1988; BRAVO *et al.*, 1992; PIGOTT e ELLAR, 2007). Em lepidópteros, a toxina Cry1A liga-se a uma aminopeptidase (APN) de 120 kDa (KNIGHT *et al.*, 1994; SANGADALA *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1996; BRAVO *et al.*, 2007) e a proteínas do tipo caderina (Bt-R₁) de 210 kDa em *Manduca sexta* (VADLAMUDI *et al.*, 1995). Quando realizados estudos de interação e especificidade das tóxicas Cry com esses receptores, são notadas diferenças de afinidade de ligação, onde a forte interação com as caderinas Bt-R₁ sugere uma primeira ligação da toxina com as microvilosidades da membrana (VADLAMUDI *et al.*, 1993). Após essa ligação, o contato intermonomérico de quatro moléculas forma uma estrutura oligomérica, conhecida como pré-poro que, subseqüentemente, se insere na região apical da membrana para formação do poro (VIE *et al.*, 2001; GÓMEZ *et al.*, 2002; RAUSELL *et al.*, 2004). Estudos recentes mostraram que caderinas e aminopeptidases interagem de modo consecutivo com diferentes estruturas da toxina. Inicialmente, o fragmento tóxico se liga com as caderinas ocasionando a primeira modificação conformacional da proteína. Essa modificação expõe a região da primeira α -hélice, que é proteoliticamente clivada por uma protease de membrana, exibindo, dessa forma, a proteína que tende a formar o tetrâmero, complexo pré-poro (GÓMEZ *et al.*, 2002). Esse oligômero liga-se a aminopeptidase, que está ancorada na membrana, através de glicosilfosfatidilinositol (GPI), coordenando o complexo para a membrana, causando a inserção e, subseqüente, formação do poro (BRAVO *et al.*, 2004; PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2006). Assim, as células epiteliais morrem por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH (WOLFERSBERGER, 1992) e por citólise osmótica (KNOWLES e ELLAR, 1987). As toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho. Isso causa um colapso na diferença de potencial e, portanto, perda de força motriz que dirige a entrada de aminoácidos ao interior celular, assim como promove a redistribuição dos cátions entre o lúmen e o citoplasma. O efeito mais devastador desse processo é a alcalinização do citoplasma, que interfere no metabolismo celular normal e tem como conseqüência final a destruição do epitélio intestinal (HARVEY, 1992; WOLFERSBERGER, 1992). Uma vez destruídas as células colunares e caliciformes, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso a hemolinfa, na qual proliferam. A conseqüência final da destruição do intestino

médio e da proliferação de bactérias na hemolinfa é a morte das larvas por inanição e septicemia.

2.1.5. Desenvolvimento de Plantas Bt

Devido ao fato, dessas toxinas Cry se ligarem a receptores específicos presentes na membrana do intestino do inseto, elas são caracterizadas como não nocivas a mamíferos, aves, anfíbios e répteis, sendo seletivas para grupos de insetos e alguns invertebrados. Isso as torna uma ótima ferramenta biotecnológica, no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, expressando proteínas entomotóxicas com atividade inseticida específica.

Dessa forma inúmeros genes *cry* têm sido introduzidos em plantas, tais como fumo, tomate, batata, algodão, milho e outras (BARTON *et al.*, 1987; FISCHHOFF *et al.*, 1987; VAECK *et al.*, 1987; PERLAK *et al.*, 1990; JAMES, 2007), inclusive com modificações genéticas e fusões de genes, resultando num espectro de ação mais amplo. Tais alterações diminuem os custos finais de produção, além de aumentar a produtividade em função do melhor controle de pragas, não havendo em toda a História da Ciência, uma tecnologia com tamanha aceitação como a engenharia genética de plantas. Em resposta a essa expansão, países têm desenvolvido uma regulamentação de biossegurança para pesquisa, desenvolvimento e liberação no meio ambiente de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs).

2.2. Desenvolvimento do protocolo de Biossegurança

A partir da década 80, com o aperfeiçoamento das técnicas de engenharia genética a preocupação com a criação de regulamentação de biossegurança aumentou. Desse modo organismos internacionais como, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), FAO (*Food and Agriculture Organization*) e OMS (Organização Mundial de Saúde) elaboraram um relatório intitulado “Recombinant DNA Safety Considerations”. Desde então as normas de biossegurança

vem sendo internacionalmente analisadas, visando assegurar que os processos biotecnológicos se realizem sem prejudicar a saúde humana e o meio ambiente

Para alcançar esse objetivo foi feita uma compilação dos dados existentes sobre o desenvolvimento de plantas transgênicas, de forma a estabelecer alternativa viável e segura para o uso na nova tecnologia. Dentre os diversos relatórios e documentos pesquisados sobre o assunto, o Relatório preparado sob os auspícios da Royal Society de Londres, Academia nacional de Ciências dos Estados Unidos, Academia Brasileira de Ciências, Academia de Ciências da China, Academia Nacional de Ciências da Índia, Academia de Ciências do México e Academia de Ciências do Terceiro Mundo e assim Na Conferência das Partes, em 1996 na Argentina, foi redigido e aprovado o uso das Normas Técnicas de Biossegurança do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), fazendo referência à saúde humana e a segurança ambiental na aplicação da biotecnologia, que vai da pesquisa e desenvolvimento até a comercialização dos produtos biotecnológicos (Fontes, 1998).

Em janeiro de 2000, em Montreal no Canadá, foi assinado por 176 países o Protocolo de Cartagena ou Protocolo Internacional de Biossegurança, no qual permite um maior controle sobre os OGM. O protocolo impõe condições para o comércio internacional dos produtos transgênicos sendo os pontos principais, o princípio de equivalência, de precaução e a rotulagem dos produtos transgênicos (NODARI e GUERRA, 2000), visando estabelecer um regime internacional para o movimento transfronteiriço de OGMs.

Sendo o Brasil um país essencialmente agro-exportador, o estabelecimento de normas de biossegurança, bem como a infra-estrutura institucional específica para regular o uso da engenharia genética e liberação no ambiente e para o consumo de Organismos Geneticamente modificados tornou-se necessário. Assim, no Brasil, qualquer empresa (pública ou privada) que queira pesquisar, cultivar ou comercializar transgênicos, deve atender às exigências de cinco órgãos: a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (Ibama), o Ministério do Meio Ambiente (MMA) e o Conselho Nacional de Meio Ambiente (Conama).

A CTNBio, órgão responsável por "emitir parecer técnico prévio conclusivo sobre registro, uso, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, liberação e descarte de produto contendo OGM ou derivados, encaminhando-o ao órgão de fiscalização competente", estabelece uma série de normas para que seja autorizada a

liberação de transgênicos no meio ambiente. Em seguida, há as exigências da Anvisa, do Ibama e do Ministério do Meio Ambiente, que, em conjunto fornecem o chamado Registro Especial Temporário (RET), no qual se aplica a OGM com característica biocida, ou seja, que eliminam bactérias, insetos, e outras pragas, que poderiam eventualmente ameaçar outras espécies que não aquelas para que foram "programados".

Finalmente, o Conama, estabelece critérios e procedimentos para licenciamento ambiental e exigência de Estudo de Impacto Ambiental (EIA/RIMA) para atividades e empreendimentos com OGM e seus derivados.

2.3. Biossegurança de Transgênicos

Com vistas a estabelecer um regime internacional para produção e comercialização de OGMs, foram estabelecidos os procedimentos para regulamentação de um protocolo internacional de biossegurança, denominado de Protocolo Cartagena.

A principal preocupação internacional está voltada para os princípios e as normas a serem aplicados ao uso da engenharia genética para o desenvolvimento de OGMs, visando assegurar que os processos biotecnológicos aumentem a produção e a qualidade dos alimentos, reduzam o impacto da agricultura no meio ambiente, através da diminuição do uso de agrotóxicos e químicos, e elevem o valor nutricional dos alimentos, sem afetar a saúde humana e o meio ambiente (EFSA, 2006a). Assim sendo, tornou-se essencial o desenvolvimento de metodologias para avaliação da segurança dos alimentos geneticamente modificados (AGM) (ENTRANSFOOD, 2004; EFSA, 2006a).

A avaliação de segurança de alimentos GM envolve o conhecimento de vários fatores: a) Quantidade de alimentos GM que a população provavelmente consumirá; b) Descrição detalhada do que é o alimento e de como ele foi produzido; c) Histórico de qualquer possível efeito adverso à saúde, relacionado ao organismo que está sendo modificado; d) Descrição detalhada do processo de modificação genética; e) Avaliação dos possíveis efeitos adversos, seja nutricional, toxicológico e/ou microbiológico e f) Avaliação de dados obtidos com pessoas alimentadas que consumiram o AGM sob condições controladas (DONALDSON e MAY, 2000). Assim, a FDA (*Food and Drug Administration*), a FAO e a OMS, estabeleceram como critério para avaliação dos

alimentos geneticamente modificados o conhecimento de sua Equivalência Substancial (ES).

2.3.1. O Conceito de Equivalência Substancial (ES)

A avaliação de segurança de determinados OGM é estabelecida a partir de sua Equivalência Substancial (ES). Tal abordagem não se destina ao estabelecimento da segurança absoluta, meta praticamente inatingível para qualquer alimento. O objetivo é garantir que o OGM seja tão seguro quanto seus análogos convencionais (WHO, 2000). O conceito de ES está associado, quase que somente, à avaliação de plantas geneticamente modificadas, mas também poderia ser expandido para outros OGMs, ou organismos modificados por outras biotécnicas ou, ainda, por melhoramento tradicional (PEDERSEN, 2000).

Para determinação da ES, o OGM é comparado ao seu análogo convencional, sendo identificadas similaridades e diferenças (OECD, 2007a,b). Os resultados dessa comparação direcionam o processo de avaliação, cujos fatores a serem considerados incluem: a) Identidade, fonte e composição do OGM; b) Efeitos do processamento sobre o OGM; c) Processo de transformação; d) Produto de expressão da proteína do novo DNA (sendo avaliados os efeitos fisiológicos, o potencial de toxicidade e o de alergenicidade); e) Avaliação dos possíveis efeitos secundários da expressão do gene; e f) Ingestão potencial e impacto da introdução do OGM na dieta. O tipo e extensão de estudos adicionais dependem da natureza das diferenças observadas e se estas podem ou não ser bem caracterizadas (WHO, 2000).

O estabelecimento da ES pode resultar em três possíveis afirmações:

1) O OGM é substancialmente equivalente ao análogo convencional, quanto à composição e aos seus aspectos agronômicos e toxicológicos;

2) O OGM não é substancialmente equivalente ao análogo convencional, exceto por algumas poucas diferenças claramente definidas;

3) O OGM não é substancialmente equivalente ao análogo convencional porque este não existe (DONALDSON e MAY, 2000).

O fato de o OGM ser substancialmente equivalente ao seu análogo convencional, não significa que ele seja seguro, nem elimina a necessidade de se

conduzir uma avaliação rigorosa para garantir a segurança do mesmo antes que sua comercialização seja permitida (DONALDSON e MAY, 2000). Quando o OGM difere de seu análogo pela presença de novas linhagens e produtos de transformação gênica, é possível isolar e estudar tais genes e seus derivados, de maneira análoga aos testes toxicológicos convencionais empregados na avaliação de segurança de aditivos alimentares (WALKER, 2000). Entretanto, é necessária a garantia de que o material testado é bioquímica e funcionalmente equivalente ao OGM (WHO, 2000). Por outro lado, a não equivalência substancial não significa que a utilização do OGM não seja segura, mas que há necessidade de se gerar dados de maneira extensiva que possam demonstrar a sua segurança (DONALDSON e MAY, 2000).

Organismos internacionais recomendam que o conceito de ES seja visto como um dos passos no processo de avaliação de segurança do OGM para o consumo humano. Todavia, a aplicação desse conceito não se constitui, por si só, na avaliação de segurança do OGM e não caracteriza o perigo embutido no seu consumo. Os dados devem ser obtidos e analisados, utilizando-se métodos validados e técnicas estatísticas apropriadas (WHO, 2000).

2.3.2. Avaliação de Segurança do Material Genético Introduzido

A primeira etapa da avaliação constitui-se no exame detalhado da modificação genética. Vários métodos para introdução do novo material genético, em organismo vivos, são utilizados. A escolha do método depende da espécie a ser modificada. Em plantas, os dois métodos mais comuns são a biobalística e a transformação mediada por *Agrobacterium*, adaptada ao processo que ocorre na natureza (ANZFA, 2000), enquanto os menos usados são o das microinjeções de DNA e o da introdução de plasmídeos em células da parede celular (BORÉM e SANTOS, 2001).

A caracterização do material genético inserido inclui a identificação da origem do material genético, para verificar se é proveniente de fonte patogênica, tóxica ou alergênica. Os principais parâmetros a serem avaliados são o tamanho do material genético inserido, o número de genes inseridos, a localização da inserção e a identificação das seqüências marcadoras do material genético construído, que permitem sua detecção (genes marcadores) e expressão (promotor) (IFT, 2000a).

Tendo a certeza que todos os alimentos contêm DNA, que este é digerido pelo trato gastrointestinal e que não há evidência de transferência de DNA do alimento para as células intestinais, ou para os microorganismos da flora intestinal, o DNA do alimento não é submetido à avaliação de segurança (IFT, 2000a). Entretanto, algumas pessoas têm expressado preocupação com relação à possibilidade dessa transferência. Nesse sentido, as considerações relacionadas à saúde humana dependem da natureza de cada modificação genética, em particular, e devem ser avaliadas caso a caso (ANZFA, 2000).

2.3.3. Avaliação de Segurança da Proteína Expressa pelo Gene Inserido

Após a completa caracterização do material genético, é preciso avaliar a segurança da proteína expressa pelo gene inserido. Técnicas moleculares e bioquímicas clássicas são utilizadas para verificar se o tamanho de qualquer produto novo do gene está de acordo com o esperado e, também, para quantificar tais produtos em tecidos específicos. Na maioria dos casos, esses aspectos são considerados em maiores detalhes nas etapas subseqüentes da avaliação (ANZFA, 2000).

A avaliação da segurança da proteína expressa inclui as seguintes etapas: quantificação, identificação da composição e estrutura primária da proteína, busca de similaridade com outras toxinas, alérgenos, fatores antinutricionais e proteínas funcionais, termoestabilidade, digestibilidade, testes toxicológicos e avaliação do potencial alergênico *in vitro* e *in vivo* (IFT, 2000b).

2.3.4. Toxicidade

Exposição significa dose, ou seja, quantidade determinada de um agente que pode desencadear efeitos adversos ao organismo. A exposição humana a inúmeros agentes químicos de origem natural e sintética pode implicar em toxicidade. Compostos tóxicos agem de forma aguda, produzindo lesões nos órgãos e tecidos e alterações fisiológicas diversas que podem levar a morte (EC, 2002).

A toxicidade está relacionada à absorção do composto, que depende de sua capacidade de penetração através da membrana biológica, seja na forma original ou biotransformada. Assim, a toxicidade do composto não depende necessariamente da integridade de sua estrutura química, com a qual esse se apresenta às células ou tecidos, mas, sim a afinidade aos receptores funcionais da membrana ou ao potencial de lesão ao arcabouço celular. Alguns agentes químicos, ainda que já tenham sido absorvidos, podem passar indenes pelo sistema porta-hepático, enquanto outros são rapidamente metabolizados e eliminados (OGA, 2003).

A ingestão de OGM pode implicar no aparecimento de novos constituintes xenobióticos, cujos níveis de tolerância necessitam de uma avaliação, caso a caso. Tomando-se por base os estudos de segurança química de determinado produto, há que se caracterizar, inicialmente, a dose-resposta e, com base nessa avaliação, os diversos níveis de efeitos. Idealmente, utilizando níveis máximos de valores (valores limiares) de dose (ou ingestão), cujos efeitos deletérios não sejam detectáveis na morfologia, na capacidade funcional, no crescimento, no desenvolvimento e na sobrevivência do organismo (WHO, 1987). Entretanto, é consenso que técnicas adicionais precisam ser desenvolvidas para analisar mudanças complexas e substanciais provindas de AGM, tanto individualmente, quanto sob a forma de misturas (SOT, 2002).

Os alimentos são constituídos por misturas complexas de vários compostos e são caracterizados por sua ampla variação na composição e valor nutricional. Devido ao seu volume e efeito nos mecanismos de saciedade, os alimentos são usualmente fornecidos a animais em quantidades equivalentes a múltiplos daquela que, provavelmente, estaria presente na dieta humana (WHO, 2000; DONALDSON e MAY, 2000; EFSA, 2006a). Um fator-chave a ser considerado na condução desse tipo de estudo, é o valor nutricional do alimento e, conseqüentemente, o balanceamento da dieta utilizada. A detecção de qualquer efeito adverso e a relação deste à determinada característica individual do alimento pode ser, algumas vezes, extremamente difícil. Todavia, deve ser considerado, ao se decidir sobre a necessidade desse tipo de estudo, a exposição de animais experimentais ao OGM, ainda que a obtenção de informações relevantes seja improvável (WHO, 2000). As dificuldades de aplicação de testes toxicológicos tradicionais e de procedimentos na avaliação de risco conduziram a uma abordagem alternativa que possibilitasse a avaliação dos OGMs, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento do conceito de ES, mencionado anteriormente (WHO, 2000)

Um fato interessante, particularmente diante de toda cobrança e especulação relacionadas à segurança de OGMs, é que poucos alimentos convencionais (não geneticamente modificados) consumidos foram submetidos a quaisquer testes toxicológicos. Mesmo assim, esses alimentos são quase sempre aceitos como sendo seguros (TOMLISON, 2000). Muitos dos alimentos convencionais existentes, provavelmente, apresentariam efeitos adversos, se os mesmos fossem consumidos em doses suficientemente altas (DONALDSON e MAY, 2000) ou mesmo processados inadequadamente.

2.3.5. Potencial Alergênico

Alergias alimentares atingem aproximadamente 6% das crianças e por volta de 2% da população mundial e, em alguns casos, podem levar ao choque anafilático (SAMPSON, 2003). Alergias alimentares são reações adversas, provocadas por determinado alimento ou por um de seus componentes, tendo como mediador o sistema imune, envolvendo a participação de anticorpos da classe IgE (PASTORELLO *et al.*, 1998). A substância capaz de desencadear a alergia recebe o nome de alergênico ou alérgeno. Quase todos alérgenos alimentares são proteínas, embora exista a possibilidade de outros componentes atuarem como haptenos (pequenas moléculas que podem interagir com proteínas do organismo, desencadeando alergenidade) (PASTORELLO *et al.*, 1998; WHO, 2000; EFSA, 2006a).

Os alimentos mais comumente envolvidos em alergia alimentar são: leite de vaca, carne de porco, ovo, peixe, tomate, laranja, banana, soja, nozes, amendoim, trigo, chocolate, camarão e marisco, respondendo por 90% de todas as respostas alérgicas a alimentos, de moderada a severa. Todavia, consta na literatura que mais de 160 alimentos estão associados com reações alérgicas esporádicas (METCALFE *et al.*, 1996). Com exceção da alergia humana induzida por soja contendo albumina 2S de castanha-do-pará (ARHARD *et al.*, 1991), não se tem conhecimento de produto agrícola ou AGM aprovado que sejam alérgenos. Porém, é consenso que testes de alergenidade são necessários em AGM, já que, usualmente, eles contêm novas proteínas.

Metcalf e colaboradores (1996) propuseram a avaliação do potencial alergênico de plantas geneticamente modificadas “engenheiradas”. Desde, então, houve

evolução técnica e maior discernimento de alguns conceitos, particularmente no que se refere aos testes *in vitro* e *in vivo*, bem como quanto à proposta de validação de modelos experimentais, que utilizam animais de laboratório para testes de AGMs (DEARMAN e KIMBER, 2001; PENNIKS e KNIPPEL, 2001; DE JONGE *et al.*, 2006). Nesse contexto, o Conselho Internacional de Biotecnologia de Alimentos e o Instituto de Alergia e Imunologia do **International Life Science Institute** (ILSI) desenvolveram, em 1996, metodologias para avaliar o potencial de alergenicidade de novas proteínas de AGM, tendo sido revisada, em 2001, por peritos que participaram da consulta conjunta da FAO/WHO sobre alimentos derivados da biotecnologia (WHO, 2001). A atual metodologia requer o exame de vários parâmetros que são comuns a muitos alérgenos alimentares. Os critérios mais relevantes, incluem: fonte do material geneticamente transferido (precaução especial deve ser tomada se a fonte do material contiver alérgenos conhecidos); similaridade da seqüência de aminoácidos; imunoreatividade da proteína introduzida; efeito do pH e/ou digestão (a maioria dos alérgenos é resistente à acidez gástrica e às proteases digestivas) e estabilidade ao calor ou ao processamento (OMS, 2000).

2.3.6. Avaliação de Segurança da Composição do Alimento

Plantas utilizadas como alimento contêm toxinas naturais, cujos níveis podem variar amplamente entre diferentes linhagens da mesma espécie. Esses níveis também podem variar entre plantas da mesma linhagem, como resultado da influência de fatores externos, como clima, estação do ano e local em que a planta foi cultivada. Em número muito reduzido de casos, foi constatado que novas variedades, desenvolvidas por meios convencionais, com características agrônômicas e de processamento melhoradas, continham níveis de toxinas inaceitavelmente elevados (WHO, 1991).

As análises para determinação da composição de AGM e seus derivados devem focar o conteúdo de nutrientes-chave (macro e micronutrientes), de componentes tóxicos e de fatores antinutricionais. A escolha adequada de um alimento-referência para se estabelecer à equivalência substancial (ES) em termos de composição depende de alguns fatores. O alimento-referência utilizado na comparação pode ser linhagem ou cepa parental e/ou linhagem ou cepa comestível da mesma espécie. O alimento

referência deve refletir a composição centesimal média encontrada em alimentos convencionais semelhantes, seu consumo, sua importância na dieta e seus efeitos no processamento (HUGGETT e VERSCHUREN, 1996). É apropriado comparar matérias-primas não processadas. Entretanto, se o alimento só for consumido processado, a comparação pode ser realizada entre o AGM e o alimento convencional processado da mesma forma (OCDE, 1998; EFSA, 2007a,b).

Todavia, apesar de serem considerados alguns critérios para escolha do alimento de referência, o estabelecimento da ES para AGMs pode seguir procedimentos diferenciados, que devem ser analisados criteriosamente caso a caso. Baseado nisso, atualmente, há várias propostas para avaliação de ES de AGMs.

No presente trabalho, albumina da clara do ovo (egg white from chicken, Sigma E0500) foram utilizadas como proteína de referência. Essa proteína é de elevado valor biológico, sendo considerada uma proteína completa por conter todos os aminoácidos essenciais em quantidades e proporções ideais para atender às necessidades orgânicas. Além disso, essas proteínas não possuem propriedades antinutricionais e tóxicas sendo utilizadas, há várias décadas, em vários trabalhos, como controle na avaliação de propriedades antinutricionais e/ou tóxicas de amostras testes, por serem consideradas uma fonte de proteína ideal (VASCONCELOS *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

3 – JUSTIFICATIVA

Com a aprovação do plantio do OGM em nosso país, através da Lei de Biossegurança/2005, tornou-se necessário ampliar os estudos toxicológicos de proteínas expressas em culturas transgênicas de interesse econômico, a fim de garantir a sua segurança na alimentação humana e animal.

Os genes *cry*, denominados *cry11a12* e *cry8Ha1*, isolados pelo nosso grupo de pesquisa (MAGALHÃES, 2006; GROSSI DE SÁ *et al.*, 2007), a partir de uma estirpe de *B. thuringiensis*, estão sendo introduzidos em plantas de algodão, com o intuito de gerar resistência ao ataque de insetos-praga, reduzindo dessa forma o uso indiscriminado de pesticidas, aumentando a qualidade dos produtos finais.

Nesse contexto, a realização das atividades no presente projeto de pesquisa se justifica devido à importância na geração de resultados, com foco nos efeitos antinutricionais e/ou tóxicos das proteínas recombinantes Cry11a12 e Cry8Ha1 para mamíferos (ratos), em experimentos sub-crônicos e agudos. Os resultados obtidos serão importantes na elucidação dos possíveis impactos dessas proteínas em sistemas biológicos, no sentido de garantir a sua utilização com segurança, fornecendo subsídios nas discussões sobre transgênicos e conferindo ao produto brasileiro qualidade e competitividade.

4 – OBJETIVOS

4.1. Geral

Este projeto teve como objetivo a obtenção das proteínas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 e a avaliação de seus efeitos sub-crônicos e agudo em mamíferos, quando consumidas como integrantes da dieta e administradas por via oral, respectivamente.

4.2. Específicos

- Construção de vetores de expressão contendo os genes *cry1Ia12* e *cry8Ha1*;
- Expressão em larga escala dos genes em sistema heterólogo (*Escherichia coli*);
- Purificação em larga escala das proteínas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1;
- Avaliar os efeitos sub-crônicos das toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, por via oral, quando introduzidas na dieta de animais experimentais (ratos), por meio da análise do desempenho dos animais (ratos), de órgãos internos e da bioquímica do sangue;
- Avaliar os efeitos agudos das toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 até 24 horas após sua administração oral a ratos, em dose única, observando a taxa de mortalidade e o surgimento de alterações macroscópicas em órgão internos dos animais.

5 – METODOLOGIAS

5.1. Obtenção das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1

5.1.1. Construção dos Vetores de Expressão Contendo os Genes *cry1Ia12* e *cry8Ha1*

Foram desenhados oligonucleotídeos com base no códon de iniciação (ATG) dos genes, com adição da sequência CACC na região 5' do oligonucleotídeo em orientação “sense”. A amplificação foi realizada por PCR e o produto da amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% e purificado. Os fragmentos gênicos purificados representados esquematicamente (Figura 2, A e B) foram, posteriormente, ligados no vetor pET101 do sistema pET Directional TOPO Cloning (Invitrogen) (Figura 2, C).

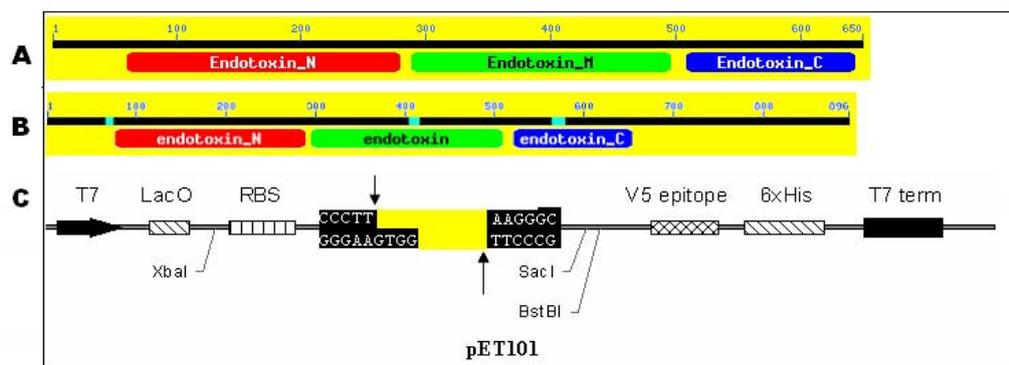


Figura 2. Representação esquemática dos fragmentos gênicos e do vetor de expressão. Os fragmentos gênicos (A) *cry1Ia12*; (B) *cry8Ha1*; foram ligados no (C) vetor pET101 do sistema pET Directional TOPO Cloning (Invitrogen).

O oligonucleotídeo “antisense” não possui o códon de terminação, pois o mesmo encontra-se logo após a cauda de poli-histidina. O produto da ligação foi, então, transformado em células de *E. coli* linhagem TOP10 e, posteriormente, semeadas em placas contendo meio de cultura. A seleção das colônias contendo o vetor de interesse

foi realizada pela resistência ao antibiótico ampicilina. Para verificação de clones positivos foi realizado PCR de colônia, utilizando como molde as bactérias transformadas e as mesmas condições descritas para a amplificação dos genes.

5.1.2. Expressão dos Genes *cryIIa12* e *cry8Ha1* em *E. coli*

Células competentes de *E. coli* linhagem BL21-Star (DE3) foram transformadas com as construções dos vetores de expressão *pET101/cryIIa12* e *pET101/cry8Ha1* (Figura 3, A e B). A seleção das colônias contendo o vetor de interesse foi realizada pela resistência ao antibiótico ampicilina (100 µg/mL). Para verificação de clones positivos, foram realizados PCR de colônia, utilizando as mesmas condições descritas para a amplificação dos genes. As células transformadas com *pET101/cryIIa12* e *pET101/cry8Ha1* cresceram em 500 mL de meio LB em frascos de 2 L, a 37 °C, a 200 rpm, na presença de ampicilina (200 µg/mL), até alcançar uma O.D.₆₀₀ = 0,6-0,8. A indução da expressão das proteínas CryIIa12 e Cry8Ha1 foi realizada com a adição de isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 mM, a 37 °C, por 16 horas para o gene *cry8Ha1* e 17 horas para o gene *cryIIa12*. Ao término da expressão, as células foram centrifugadas a 6.000 rpm, por 20 minutos. O pellet contendo as células foi ressuspenso em tampão de lise (tampão fosfato de sódio 50 mM, 1% NaCl 300 mM e Triton X-100, pH 7,0) e sonificado 10 vezes, por 1 minuto (large tip, Versonic Cell Disrupter – Model 16-850). As células foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 40 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi analisado por PAGE-SDS 12% (LAEMMLI, 1970).



Figura 3. Representação esquemática dos vetores de expressão *pET101/cryIIa12* e *pET101/cry8Ha1*. Os fragmentos gênicos (A) *pET101/cryIIa12*; (B) *pET101/cry8Ha1*.

5.1.3. Purificação das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1

Para purificação das toxinas obtidas na expressão foi realizada uma cromatografia de afinidade em resina de níquel (Ni^{2+} nitrilo-triacetic acid affinity resin, Ni-NTA, Qiagen). A resina foi empacotada em uma coluna de vidro e equilibrada com 4 volumes de coluna com a solução de equilíbrio, constituída por tampão fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 7,8. A amostra foi aplicada à coluna e, posteriormente, o sistema foi lavado com 6 volumes de coluna com a mesma solução de equilíbrio. Em seguida, a proteína foi eluída com o tampão de eluição composto por tampão fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 7,8. As proteínas eluídas foram dialisadas contra água a 4 °C, quantificadas pelo método de Bradford (1976) e submetidas a PAGE-SDS (LAEMMLI, 1970).

5.1.4. Determinação de Proteína

Para determinação do teor de proteínas foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). Foram utilizados 150 μL de água, 10 μL da amostra e 40 μL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos em repouso foram feitas leituras das absorbâncias a 595 nm. A concentração protéica foi estimada através de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de BSA.

5.1.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

O perfil eletroforético das proteínas recombinantes foi analisado segundo a técnica de Laemmli (1970). O gel de aplicação encerrava 3,9% de acrilamida e 10% de

SDS, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o de separação 12% de acrilamida e 10,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. As amostras contendo 1% de β -mercaptoetanol foram aquecidas a 100 °C, por 5 minutos, centrifugadas a 10000 x g, 5 minutos, a 10 °C. Aos sobrenadantes, foram acrescentados cristais de sacarose e azul de bromofenol a fim de conferir densidade e cor às amostras, respectivamente. As bandas protéicas foram visualizadas por revelação com prata (BLUM *et al.*, 1987). A metodologia utilizada consistiu de várias etapas e soluções: solução de fixação (metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,5 mL/L), solução de lavagem (etanol 50%), solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,2 g/L), solução de impregnação (nitrato de prata 2 g/L e formaldeído 0,75 mL/L), solução de revelação (carbonato de sódio 60 g/L, formaldeído 0,5 mL/L e tiosulfato de sódio 0,2 g/L), solução de bloqueio da reação (metanol 50% e ácido acético 12%) e solução de enxague e acondicionamento (metanol 50%). Comparação das mobilidades das bandas protéicas da toxina em relação àquelas dos marcadores foi empregada para o cálculo da massa molecular aparente da proteína em análise.

5.2. Ensaio Biológicos

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991) e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará – CEPA/UFC.

5.2.1. Avaliação dos Efeitos Sub-crônicos das Proteínas Recombinantes CryIIa12 e Cry8Ha1 por Via Oral

Esse ensaio teve como objetivo avaliar se em um experimento de curta duração, apenas 10 dias, considerado sub-crônico, seria possível verificar algum efeito que pudesse ser relacionado ao consumo das proteínas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1. Essas proteínas foram incluídas como componentes de dietas para ratos em crescimento, durante 10 dias, tendo sido selecionados neste trabalho como modelo animal para avaliar os possíveis efeitos dessas proteínas em mamíferos. Ratos (*Rattus norvegicus*) brancos, machos, da linhagem “Wistar”, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Para realização desse ensaio foram preparadas quatro dietas: 1) Dieta não protéica (NPC); 2) Dieta padrão, formulada com proteína da clara do ovo (EW), considerada como alimento referência, dada ao seu elevado valor biológico; 3) Dieta contendo a proteína Cry1Ia12 (99,9 g de proteínas da clara do ovo e 0,1 g de Cry1Ia12) e 4) Dieta contendo Cry8Ha1 (99,9 g de proteínas da clara do ovo e 0,1 g de Cry8Ha1). Todas as dietas, com exceção da dieta aprotéica, foram isoprotéicas de modo a conter 100 g de proteína por Kg de dieta (100 g/Kg), ou seja, 10% de proteína. As proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 corresponderam 0,1% da proteína total (Tabela 2).

Tabela 2. Composição (g/Kg) das dietas controles (NPC, aprotéica; padrão, à base de clara do ovo) e experimentais (Cry1Ia12 e Cry8Ha1)

Ingredientes	Dietas			
	Aprotéica	Padrão	Cry1Ia12	Cry8Ha1
Amido de milho	475	342,55	342,55	342,55
Glicose	150	150	150	150
Óleo de milho	150	150	150	150
Mistura vitaminas*	50	50	50	50
Mistura minerais**	50	50	50	50
Fibra (80%)	125	125	125	125
Clara do ovo (75,5%)	-	132,45	132,35	132,35
Cry1Ia12	-	-	0,1	-
Cry8Ha1	-	-	-	0,1

* Mistura de vitaminas (g/Kg): [vitamina B₁₂ (100%) 0,02; ácido fólico 0,04; biotina (99%) 0,04; piridoxina HCl 0,04; tiamina HCl 0,04; riboflavina (99%) 0,21; pantotenato de cálcio (97,5%) 1,20; ácido nicotínico 4,00; inositol 4,00; *p*-amino-benzóico 12,00; cloreto de colina (50%) 24,00 e amido de milho 954,39].

** Mistura de minerais (sulfato de cobre pentahidratado 0,40; sulfato férrico heptahidratado 5,00; sulfato manganês 3,03; sulfato de zinco heptahidratado 3,60; iodato de potássio 0,04; iodeto de potássio 0,04; fluoreto de sódio 0,12; vanadato de amônia 0,01; cloreto de níquel hexahidratado 0,08; clorato de estanho pentahidratado 0,12; selenito de sódio 0,006).

Na avaliação dos efeitos sub-crônicos foi seguida a técnica descrita por Miller e Bender (1955). Ratos “Wistar”, machos, desmamados com 21 dias de idade, foram alimentados com ração comercial peletizada até atingirem peso médio de 55 g. Os

animais foram alimentados com uma dieta contendo proteínas da clara do ovo, *ad libitum*, por três dias, para adaptação à sua forma pulverizada, sendo, então, selecionados de acordo com o peso corpóreo (70 ± 5 g). Em seguida, os ratos foram alimentados com dietas aprotéica, referência e experimentais (contendo as proteínas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1), durante 10 dias. Para cada dieta, foram usados 6 animais, mantidos em gaiolas metabólicas individuais (Figura 4), que possibilitam a coleta de fezes, urina e dieta perdida. Água e dieta foram oferecidas *ad libitum*. As dietas controles e experimentais

Durante todo experimento, os ratos e a dieta refugada foram pesados diariamente. As fezes e a urina foram coletadas durante os últimos cinco dias do experimento para posterior determinação de nitrogênio (BAETHGEN e ALLEY, 1989). As fezes foram secadas em estufa sob ventilação a 40 °C, por 24 horas, pesadas e trituradas em moinho para café. Ao final dos 10 dias, foram coletadas amostras (2 mL) de sangue dos animais via plexo orbital e, em seguida, estes foram sacrificados por inalação com halotano, sendo seus órgãos internos (baço, coração, fígado, rins, estômago, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas, pulmões e timo) dissecados, liofilizados e pesados. As carcaças foram colocadas em estufa a 100 °C, por 24 horas, pesadas e trituradas, juntamente com seus respectivos órgãos, para determinação do teor de nitrogênio corporal (N) (BAETHGEN e ALLEY, 1989).

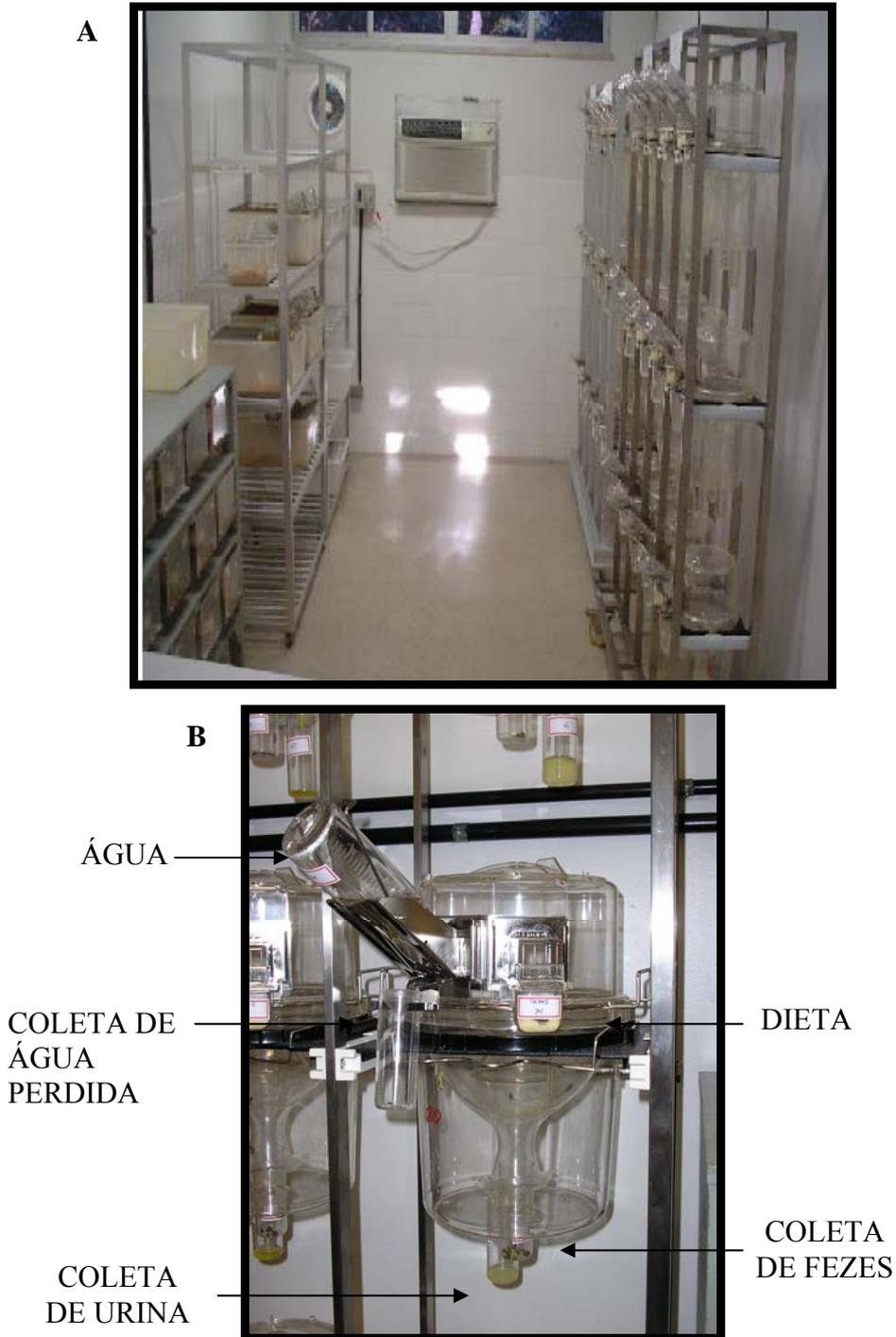


Figura 4. Gaiolas metabólicas, utilizadas pelos animais no experimento, de avaliação dos efeitos sub-crônicos e agudos das proteínas recombinantes Cry11a12 e Cry8Ha1. (A) Biotério, contendo gaiolas metabólicas utilizada pelos animais no experimento. (B) Figura detalhada da gaiola metabólica, mostrando o local para a água, dieta, coleta de fezes, coleta de urina e coleta de dieta derramada do animal experimental. Fotos: Guimarães, L. M. 2008

Os índices para avaliação dos efeitos da inclusão das proteínas recombinantes na dieta e, conseqüente, alteração da qualidade protéica do alimento referência foram a Utilização Líquida de Proteína (NPU), Digestibilidade (D) e Valor Biológico (VB) (MILLER e BENDER, 1955). As fórmulas utilizadas encontram-se a seguir:

$$NPU = \frac{N \text{ da carcaça do grupo teste} - N \text{ da carcaça do grupo aprotéico}}{N \text{ ingerido do grupo teste}}$$

$$D = \frac{N \text{ ingerido} - (N \text{ fecal do grupo teste} - N \text{ fecal do grupo aprotéico})}{N \text{ ingerido do grupo teste}}$$

$$VB = \frac{NPU}{D} \times 100$$

5.2.2. Análises Histológicas

Fragmentos coletados do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foram fixados em formol 10%, por 24 horas. Em seguida, foram processadas por meio da metodologia convencional para obtenção de fragmentos incluídos em parafina, compreendendo desidratação em soluções alcoólicas de concentração crescente (70, 80, 90, 95 e 100%), diafanização em xileno, impregnação e inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo, com espessura média de 5 µm, e corados com hematoxilina-eosina. Imagens fotomicrográficas dos cortes histológicos preparados foram obtidas com uso de câmara digital OLYMPUS D-5060 acoplada a microscópio OLYMPUS Modelo CX-40 (aumentos de 600x).

5.2.3. Bioquímica Sanguínea

Amostras de sangue dos animais foram usadas para dosagens de marcadores hepáticos [aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT)] e marcador renal (uréia) e de proteínas totais, albumina sérica e fosfatase alcalina. Nas dosagens foram utilizados kits da Bioclin (QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda, Belo Horizonte, MG), seguindo-se as instruções do fabricante.

A dosagem das transaminases (TGO – transaminase glutâmica oxalacética ou AST – aspartato aminotransferase e TGP – transaminase glutâmica pirúvica ou ALT – alanina aminotransferase) foram dosadas no soro dos animais de acordo com o princípio descrito por Reitman e Frankel (1957). Substratos (alfa-cetoglutarato, DL-aspartico ou DL-alanina) foram colocados em contato com o soro formando um produto de cor marrom em meio alcalino, cuja leitura de absorvância foi conduzida a 505 nm.

As proteínas séricas totais foram determinadas através da metodologia de Reinhold (1968), modificada por Doumas *et al* (1981), utilizando-se o reagente de Biureto, o qual se liga de forma específica com peptídeos contendo mais de duas ligações peptídicas. Tais compostos reagem com íons cúpricos em meio alcalino, produzindo um complexo de composição desconhecida de cor violeta, o qual é medido colorimetricamente a 540 nm, cuja leitura é proporcional ao número de ligações peptídicas presentes.

A determinação da concentração da albumina sérica foi feita utilizando o método de Peters *et al.* (1982), através do uso do verde bromocresol, que em pH 3,8 se liga à albumina e absorve a luz. A absorvância da solução foi verificada a 630 nm, sendo diretamente proporcional à concentração de albumina.

A taxa de fosfatase alcalina foi determinada pelo princípio de Roy (1974). A fosfatase alcalina presente na amostra hidrolisa o substrato timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína e fosfato inorgânico. Quando adicionado um reagente de cor, a timolftaleína adquire cor azul, a qual é medida colorimetricamente no comprimento de ondas de 590 nm.

5.2.4. Avaliação da Toxicidade Aguda das Proteínas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 por Via Oral (Dose Única)

Este ensaio teve como finalidade a análise da toxicidade aguda das proteínas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1, utilizando dose única, segundo metodologia descrita por Brito (1994), com modificações.

Para cálculo da dose das proteínas recombinantes a ser administrada, foi considerada a ingestão média total de cada uma delas por animal, durante os 10 dias do ensaio sub-crônico, conforme descrito no item anterior.

Na condução do ensaio, ratos com peso médio de 55 g foram adaptados em gaiolas metabólicas durante três dias, com ração comercial e água *ad libitum*. Em seguida, os animais foram submetidos ao jejum de comida por 12 horas e ao jejum total (comida e água) por mais 1 hora. Os animais foram, então, entubados com uma solução encerrando 12 mg das proteínas Cry1Ia12 ou Cry8Ha1 em 0,5 mL de NaCl 0,15 M. Como controle, foi usado apenas NaCl 0,15 M. Água e ração foram novamente oferecidas *ad libitum* aos animais 1 e 4 horas após entubação, respectivamente. Os animais (n = 3) ficaram sob observação durante 24 horas, sendo após este tempo sacrificados por inalação com halotano. Como parâmetros de toxicidade aguda, foram observadas a taxa de mortalidade dos animais e realizadas análises macroscópicas de órgãos internos.

6 – RESULTADOS

6.1. Obtenção das Toxinas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1

6.1.1. Amplificação dos Genes *cry1Ia12* e *cry8Ha1* e Construção dos Vetores de Expressão

Após a obtenção dos genes de interesse *cry1Ia12* e *cry8Ha1* (MAGALHÃES, 2006; GROSSI DE SÁ *et al.*, 2007), estes foram utilizados na construção dos vetores de expressão *pET101/cry1Ia12* e *pET101/cry8Ha1*. Na figura 3 A e B (materiais e métodos), o vetor de expressão, no qual foram inseridos os dois genes, está representado esquematicamente. Os vetores de expressão *pET101/cry1Ia12* e *pET101/cry8Ha1* foram (em experimentos distintos) transformados nas células competentes de *E. coli* TOP10 para seleção de clones positivos. As células transformadas foram semeadas em meio LB agar-amp e as colônias que cresceram no meio seletivo submetidas a uma análise de PCR de colônia. Ao final da análise, cinco clones positivos foram inoculados em meio LB-amp para purificação dos plasmídeos. Um clone positivo de cada construção foi selecionado e seqüenciado para verificação da orientação de inserção do gene (Figura 5 e 6).

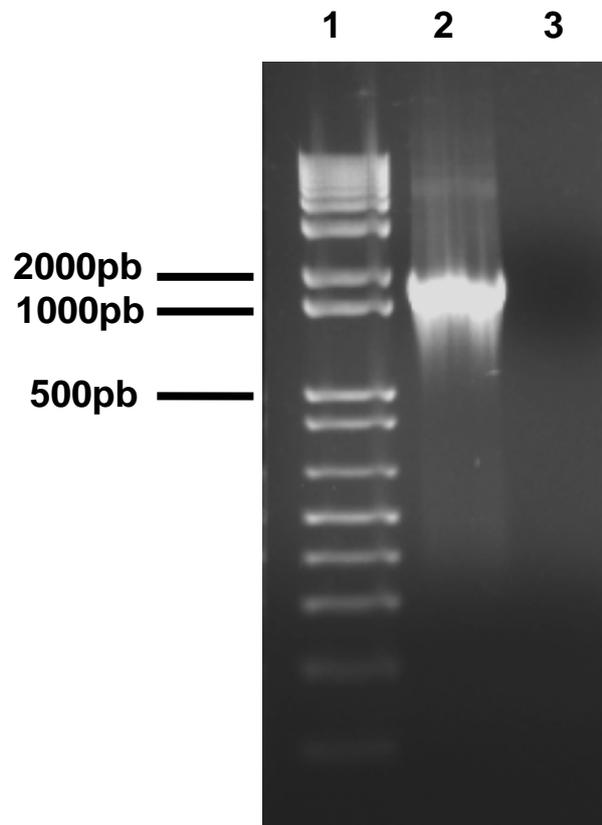


Figura 5. Amplificação do gene *cryIIa12*. Reação de PCR, gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídio. **Linha 1.** Marcador de peso molecular 1Kb ladder plus. **Linha 2.** Produto da amplificação de aproximadamente 2000 pb utilizando-se oligonucleotídeos específicos para as seqüências de *cryIIa12*. **Linha 3.** Controle negativo.

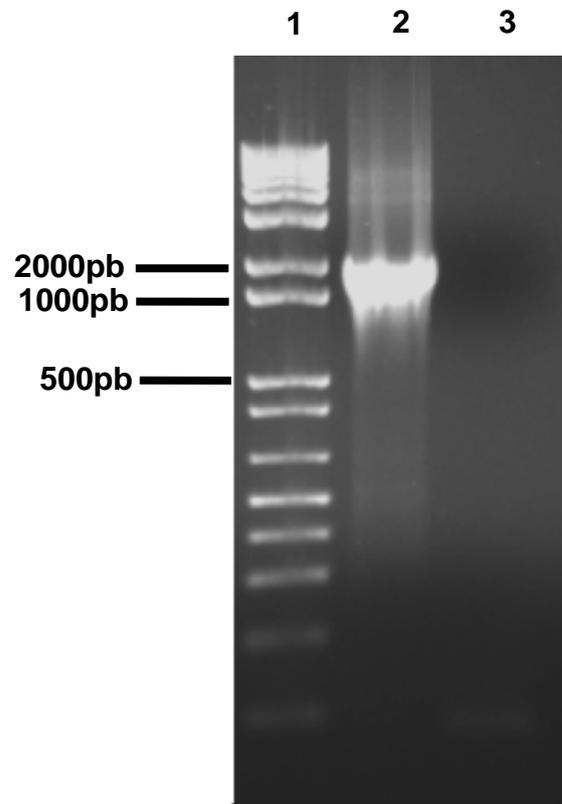


Figura 6. Amplificação do gene *cry8Ha1*. Reação de PCR, gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídio. **Linha 1.** Marcador de peso molecular 1Kb ladder plus. **Linha 2.** Produto da amplificação de aproximadamente 2000 pb utilizando-se oligonucleotídeos específicos para as seqüências de *cry8Ha1*. **Linha 3.** Controle negativo.

6.1.2. Expressão Heteróloga da Toxina CryIIa12

Nas primeiras horas após a indução das células competentes para expressão de *E. coli* BL21-Star (DE) transformada com o vetor *pET101/cryIIa12* não foi observada nenhuma banda diferencial. Somente após 14 horas de indução, a primeira banda diferencial, na faixa esperada com cerca de 80 kDa, foi detectada. Porém, foi constatado que após 17 horas de expressão havia uma quantidade maior de proteína solúvel. A obtenção de um maior rendimento era crucial para obtenção da quantidade necessária a ser usada nos ensaios biológicos em mamíferos. Dessa forma, foi utilizado o lisozima na concentração final de 2mg/mL (Sigma, Lote 035K6035), onde através deste foi obtido um melhor rendimento da proteína na forma solúvel (Figura 7).

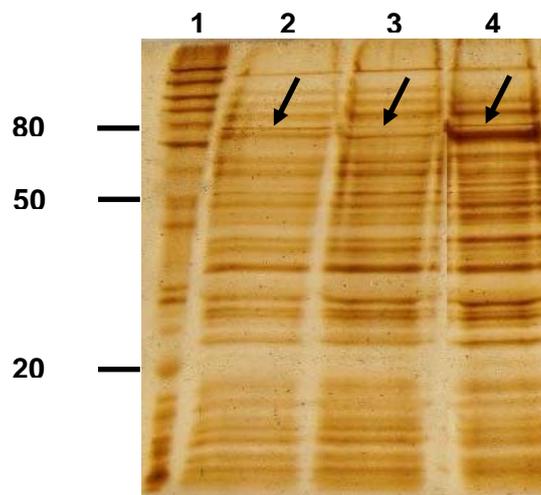


Figura 7. Análise por SDS-PAGE 12% da expressão do gene *cryIIa12* em sistema heterólogo *E. coli*. A expressão foi induzida com 1 mM IPTG. Após a indução da expressão, as células foram lisadas e o extrato solúvel foi separado do extrato insolúvel por centrifugação. **Linha 1.** Marcador de massa molecular (Invitrogen). **Linha 2.** Fração solúvel do extrato protéico após 17 horas de expressão. **Linha 3.** Fração solúvel do extrato protéico após 20 horas de expressão. **Linha 4.** Fração solúvel do extrato protéico da expressão de 17 horas após o tratamento com tampão contendo lisozima. As setas são referentes à proteína recombinante CryIIa12. 10 µg de cada amostra foram adicionadas a tampão de amostra, submetidas a SDS-PAGE 12%, a 25 mA e coradas com nitrato de prata.

6.1.3. Expressão Heteróloga da Toxina Cry8Ha1

A proteína Cry8Ha1, massa molecular em torno de 70 kDa, expressa no sistema heterólogo, foi obtida em grande quantidade na fração solúvel, após 16 horas de expressão. Ao contrário da toxina Cry11a12, a Cry8Ha1 praticamente não precipitou na forma corpos de inclusão. No entanto, ao aumentar o tempo de expressão para 20 horas, foi observada a formação de corpos de inclusão, mas grande parte da proteína ainda encontrava-se na fração solúvel. Dessa forma, foi optado por expressar esse gene por 16 horas, tempo no qual a maior quantidade de proteína recombinante solúvel seria obtida. A Figura 8 mostra os dois extratos protéicos, contendo as referidas frações solúvel e insolúvel.

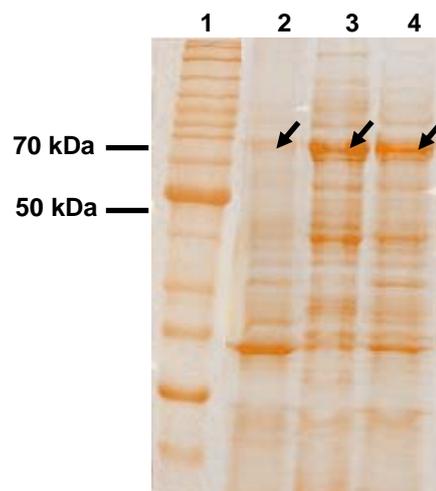


Figura 8. Análise por SDS-PAGE 12% da expressão do gene *cry8Ha1* em sistema heterólogo *E. coli*. A expressão foi induzida com 1 mM IPTG. Após a indução as células foram lisadas e o extrato solúvel foi separado do extrato insolúvel por centrifugação. **Linha 1.** Marcador de peso molecular. **Linha 2.** Fração insolúvel do produto da expressão realizada 16 h de expressão. **Linha 3.** Fração solúvel do produto da expressão realizada após 16 h de expressão. **Linha 4.** Fração solúvel do produto da expressão realizada após 20 h de expressão. As setas indicam a proteína recombinante Cry8Ha1. 10 µg de cada amostra foram adicionadas a tampão de amostra, submetidas a SDS-PAGE 12%, a 25 mA e coradas com nitrato de prata.

6.1.4. Purificação das Toxinas Recombinantes

Os rendimentos protéicos obtidos com o uso da cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA foram de 1% (2 mg/L) para Cry1Ia12 e 3% (6 mg/L) para Cry8Ha1 da proteína solúvel total. Em análise por SDS-PAGE 12%, foi observada a presença de apenas uma banda do material eluído, que corresponde às toxinas de interesse, Cry1Ia12 e Cry8Ha1 (Figura 9 e 10). Ao final da purificação, o material foi dialisado contra água, a 4 °C, e liofilizado.

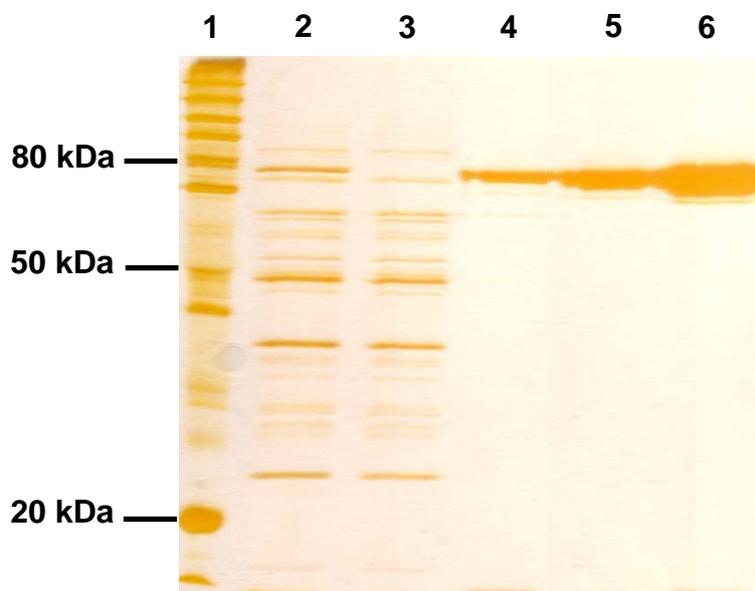


Figura 9. Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante Cry1Ia12 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA). **Linha 1.** Marcador de peso molecular. **Linha 2.** Extrato total da *E. coli* expressando a proteína recombinante Cry1Ia12. **Linha 3.** Fração não retida na resina Ni-NTA. **Linhas 4, 5 e 6.** Proteína Cry1Ia12 eluída da resina Ni-NTA em diferentes concentrações para confirmação do grau de pureza da mesma. 5 µg (linhas 2, 3 e 4), 10 µg (linha 5) e 15 µg (linha 6) de amostra. Nas mesmas, foram adicionados tampão de amostra 2x, e essas submetidas à SDS-PAGE 12%, a 25 mA e coradas com nitrato de prata.

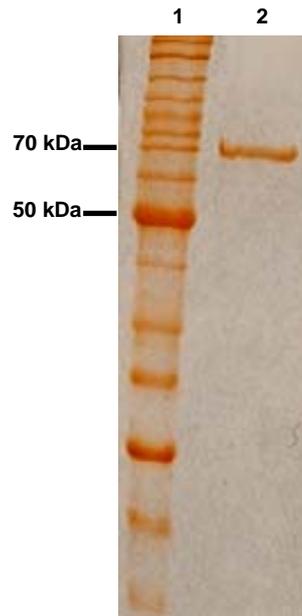


Figura 10. Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante Cry8Ha1 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA). **Linha 1.** Marcador de peso molecular. **Linha 2.** Proteína Cry8Ha1 eluída da resina Ni-NTA para confirmação do grau de pureza da mesma. 5 µg de amostra foram adicionadas a tampão de amostra, submetidas a SDS-PAGE 12%, a 25 mA e coradas com nitrato de prata.

6.2. Avaliação dos Efeitos Sub-crônicos das Proteínas Recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 por Via Oral

6.2.1. Crescimento dos Animais

As proteínas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1, incorporadas em dietas semi-sintéticas para ratos em crescimento, constituindo 0,1% da proteína total (Tabela 3), proporcionaram excelentes taxas de crescimento, semelhantes àquela verificada com a dieta referência (dieta padrão), à base de proteínas da clara do ovo (Figura 11). O desempenho dos animais foi similar para ambas proteínas recombinantes, sendo bastante superior aos apresentados por aqueles submetidos a uma dieta aprotéica.

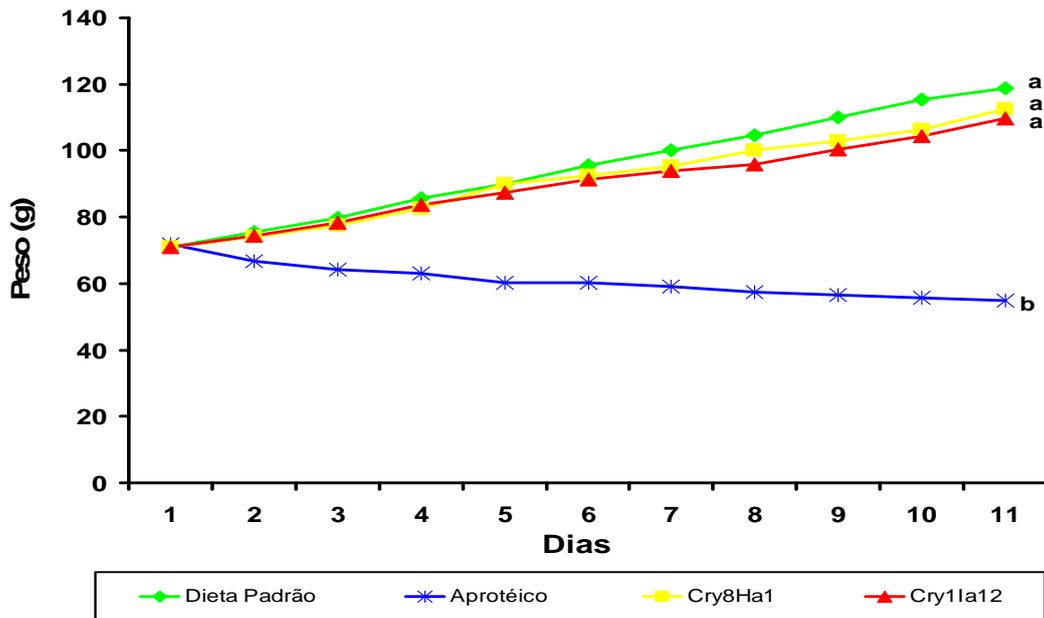


Figura 11. Curvas de crescimento dos ratos submetidos ao ensaio sub-crônico.

Avaliação do crescimento dos ratos ($n = 6$) durante 10 dias de experimento, submetidos às dietas contendo as toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparadas com o crescimento de ratos alimentados com a dieta padrão, contendo proteínas da clara do ovo (alimento referência) e dieta aprotéica. Letras iguais referem-se a resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$) teste de Turkey.

6.2.2. Ganho de Peso, Dieta Ingerida e Conversão Alimentar

Os resultados relativos à quantidade de dieta ingerida, ganho de peso e conversão alimentar dos animais estão apresentados na Tabela 3.

O consumo de dieta pelos animais ao longo do período experimental variou de $51,12 \pm 9,9$ g, nos animais alimentados com dieta aprotéica, até $118,00 \pm 11,17$ g, nos animais alimentados com a dieta padrão. A análise desse parâmetro revelou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos envolvendo a proteína de referência (proteínas da clara do ovo) e as proteínas teste Cry1Ia12 e Cry8Ha1. Os efeitos das proteínas recombinantes utilizadas revelaram-se não significativos para o consumo.

O ganho de peso dos ratos variou de $-17,65 \pm 3,10$ a $48,87 \pm 5,88$ g, observando-se notória inferioridade nos animais mantidos com a dieta aprotéica e melhores desempenhos nos tratamentos com a dieta padrão e com as proteínas recombinantes, sem diferença significativa entre os mesmos ($p > 0,05$). Os efeitos das proteínas testadas, Cry1Ia12 e Cry8Ha1, dentro das condições de ensaio, não foram significativos para o ganho de peso (Figura 12).

A eficiência alimentar, denominada conversão alimentar (Tabela 3) calculada pelo quociente entre o ganho de peso e a quantidade de dieta ingerida, atingiu um máximo de $0,41 \pm 0,06$ (g de ganho de peso/g de dieta ingerida), verificando-se que os tratamentos com as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 apresentaram resultados tão elevados quanto ao obtido com a proteína animal (dieta padrão), não havendo diferença significativa entre esses tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 13). Uma evidente inferioridade foi detectada para o grupo experimental com dieta aprotéica, tendo sido a eficiência alimentar, inclusive, negativa ($- 0,34 \pm 0,04$). Mais uma vez, as proteínas testadas não tiveram efeitos significativos sobre esta variável.

Tabela 3. Ganho de peso, dieta ingerida e conversão alimentar de ratos (n = 6) submetidos a dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparados com os dos animais alimentados com a dieta padrão, contendo proteínas da clara do ovo (alimento referência) e dieta aprotéica

Dietas *	Ganho de Peso (g)*	Dieta Ingerida (g)*	Conversão Alimentar
Aprotéica	-17,65 ± 3,10 ^b	51,12 ± 9,90 ^b	-0,34 ± 0,04 ^b
Padrão	48,87 ± 5,88 ^a	118,00 ± 11,17 ^a	0,41 ± 0,06 ^a
Cry1Ia12	38,95 ± 11,41 ^a	110,43 ± 7,10 ^a	0,35 ± 0,10 ^a
Cry8Ha1	42,34 ± 6,72 ^a	113,35 ± 8,60 ^a	0,37 ± 0,05 ^a

Média ± desvio padrão. Letras iguais na vertical referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

* Os valores estão expressos em g/rato.

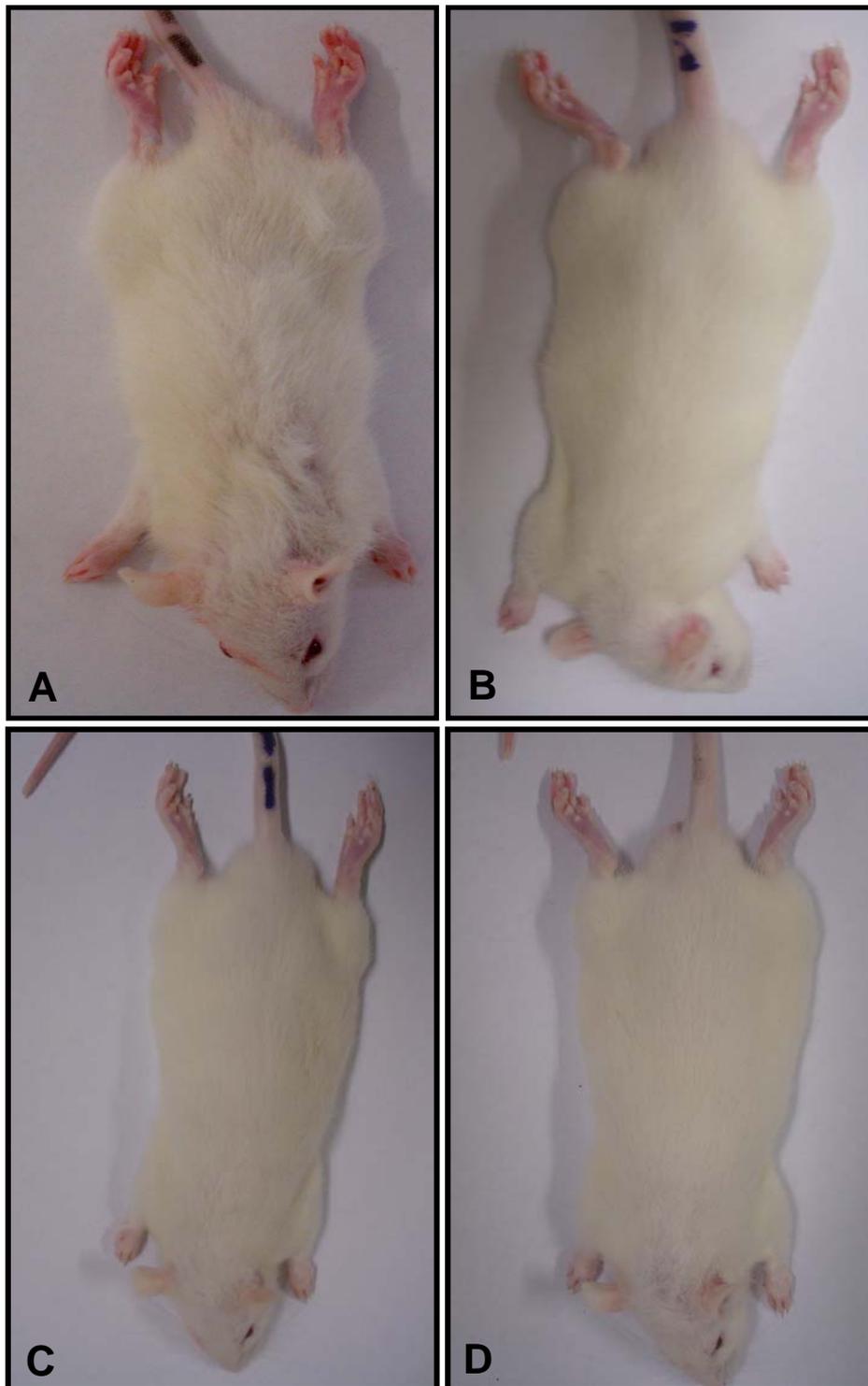


Figura 12. Comparação do tamanho dos animais submetidos à avaliação do ensaio sub-crônico. (A) Tamanho do rato alimentado com dieta aprotéica. **(B)** Tamanho do rato alimentado com a dieta contendo clara de ovo (EW). **(C)** Tamanho do rato alimentado com a dieta contendo a toxinas Cry8Ha1. **(D)** Tamanho do rato alimentado com a dieta contendo a toxina Cry1Ia12.

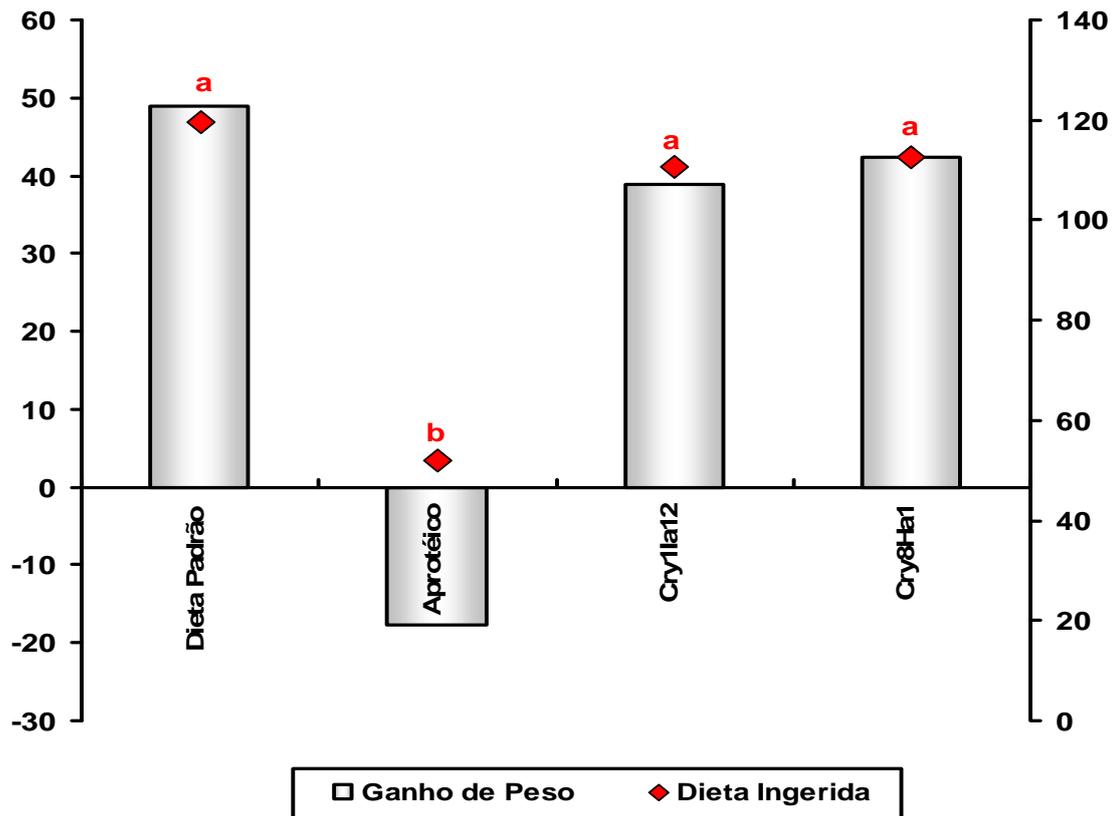


Figura 13. Gráfico referente à quantidade de dieta ingerida, ganho de peso e conversão alimentar dos animais experimentais. O eixo y à esquerda refere-se à quantidade de dieta ingerida ao longo dos 10 dias e o eixo y à direita refere-se ao ganho de peso dos animais, avaliando assim, os efeitos da inclusão das proteínas Cry11a12 e Cry8Ha1 sobre a eficiência alimentar de ratos em crescimento ($n = 6$), comparados com as dietas padrão e dieta aprotéica. Letras iguais referem-se a resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$), teste de Turkey.

6.2.3. Balanco Nitrogenado

Os resultados referentes à dieta ingerida, nitrogênio ingerido e excreção fecal e nitrogênio fecal, analisados apenas nos últimos 5 dias de experimento encontram-se descritos na Tabela 5.

Os animais alimentados com a dieta padrão apresentaram um maior consumo de dieta ($70,64 \pm 7,53$ g/rato) e, conseqüentemente, de nitrogênio ($1,12 \pm 0,09$ g/rato) nos últimos 5 dias de experimento diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos contendo as proteínas Cry1Ia12 ($62,32 \pm 6,47$ e $0,99 \pm 0,7$ g/rato, respectivamente) e Cry8Ha1 ($62,53 \pm 6,25$ e $0,99 \pm 0,11$ g/rato, respectivamente). Todavia, quando analisados os resultados obtidos nos tratamentos com as proteínas recombinantes, diferenças estatísticas não foram detectadas.

Com relação à excreção de matéria fecal foi observado que os animais que receberam às dietas testes excretaram conteúdos semelhantes aos que consumiram a dieta padrão ($3,98 \pm 0,67$ g/rato). A excreção de nitrogênio também não diferiu estatisticamente entre os animais submetidos à dieta padrão e a dieta contendo a proteína Cry1Ia12, sendo ligeiramente menor nos animais alimentados com a dieta contendo Cry8Ha1. Apesar dessas leves diferenças detectadas entre os diferentes tratamentos, as relações de excreção fecal e dieta ingerida ($F/D \times 100$) e de nitrogênio excretado e nitrogênio ingerido ($FN/N \times 100$) mostraram-se semelhantes para todos os animais, independentemente do tratamento utilizado, mostrando que a inclusão das proteínas recombinantes na dieta não alterou o balanço nitrogenado dos animais.

Tabela 4. Balanço de nitrogênio dos ratos (n = 4) submetidos a dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparados com o dos animais alimentados com a dieta padrão, contendo proteínas da clara do ovo (alimento referência), calculado para os últimos cinco dias do experimento

Parâmetros*	Dietas		
	Padrão	Cry1Ia12	Cry8Ha1
Dieta ingerida (D)	70,64 ± 7,53 ^a	62,32 ± 6,47 ^a	62,53 ± 6,25 ^a
N ingerido (N)	1,12 ± 0,09 ^a	0,99 ± 0,17 ^a	0,99 ± 0,11 ^a
Excreção fecal (F)	3,98 ± 0,67 ^a	3,17 ± 0,69 ^a	3,32 ± 0,80 ^a
N fecal (FN)	0,16 ± 0,04 ^a	0,14 ± 0,05 ^a	0,13 ± 0,05 ^a
F/D x 100	5,27 ± 1,01 ^a	5,58 ± 0,44 ^a	5,54 ± 0,78 ^a
FN/N x 100	13,22 ± 3,27 ^a	15,05 ± 4,12 ^a	11,61 ± 3,93 ^a

Letras iguais na horizontal referem-se a valores não significativamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

* Os valores estão expressos em g/rato/5 dias.

Outros parâmetros nutricionais avaliados foram digestibilidade, NPU (Utilização Líquida de Proteína) e valor biológico (Tabela 5, Figura 14).

Os valores de digestibilidade calculados para os animais submetidos a dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 ($90,76 \pm 4,81$ e $93,72 \pm 3,62\%$, respectivamente) não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) do tratamento contendo a proteína padrão ($91,05 \pm 3,20\%$). A NPU foi um outro parâmetro que não diferiu significativamente ($p > 0,05$) quando comparados os diferentes tratamentos, cujos valores ficaram na faixa de ($89,62 \pm 10,3$ a $99,98 \pm 9,94\%$). Similarmente a digestibilidade e NPU, os valores biológicos de ambas proteínas, Cry1Ia12 e Cry8Ha1, foram similares ao da proteína padrão. Ainda que não tenha sido significativo ($p > 0,05$), o valor biológico da proteína Cry1Ia12 ($99,99 \pm 9,77\%$) foi numericamente

superior ao da proteína referência ($90,67 \pm 9,41\%$). Os resultados obtidos mostram, claramente, que a inclusão das proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 nas dietas dos animais experimentais não proporcionou alterações nos parâmetros nutricionais analisados, demonstrando a ausência de efeitos antinutricionais, nas condições realizadas.

Tabela 5. Parâmetros nutricionais obtidos pela alimentação de ratos ($n = 6$) submetidos a dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparados com o dos animais alimentados com a dieta padrão, contendo proteínas da clara do ovo (alimento referência)

Parâmetros	Dietas		
	Padrão	Cry1Ia12	Cry8Ha1
Digestibilidade (%)	$91,05 \pm 3,20^a$	$90,76 \pm 4,81^a$	$93,72 \pm 3,62^a$
NPU* (%)	$91,27 \pm 9,71^a$	$99,98 \pm 9,94^a$	$89,62 \pm 10,3^a$
Valor Biológico (%)	$90,67 \pm 9,41^a$	$99,99 \pm 9,77^a$	$86,88 \pm 10,47^a$

Média \pm desvio padrão. Letras iguais na vertical referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

* Utilização líquida de proteína.

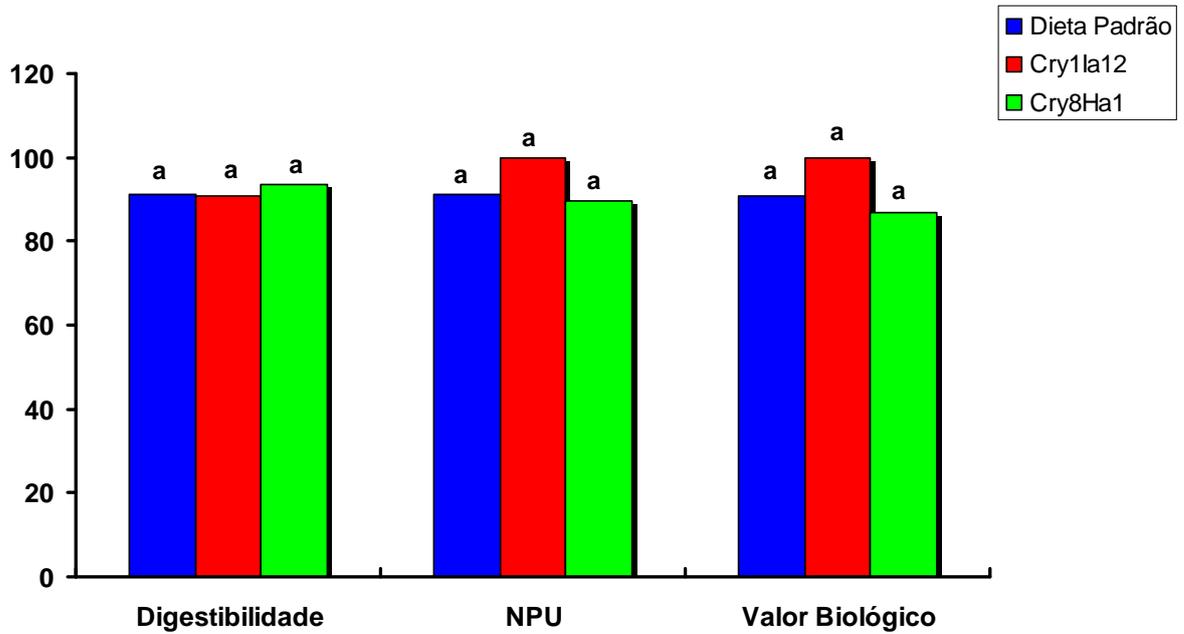


Figura 14. Análise dos parâmetros nutricionais dos animais submetidos ao ensaio sub-crônico. Valores referentes aos parâmetros nutricionais, como a digestibilidade, NPU (Utilização Líquida de Proteína) e valor biológico, obtidos pela alimentação de ratos ($n = 6$) submetidos a dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparados com o dos animais alimentados com a dieta padrão, contendo proteínas da clara do ovo (alimento referência).

6.2.4. Avaliação de Órgãos Internos dos Ratos

Após a análise de alguns parâmetros nutricionais dos animais submetidos às proteínas teste, ao final do décimo dia de experimentação os animais foram sacrificados e alguns órgãos internos como baço, coração, estômago, fígado, intestinos delgado e grosso, pâncreas, pulmões, rins e timo foram retirados, a fim de avaliar alterações conseqüentes do consumo das dietas contendo as proteínas Cry11a12 e Cry8Ha1. Procedeu-se, então às análises dos pesos relativos de alguns órgãos internos dos ratos. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 6.

Em comparação com os órgãos internos dos animais pertencentes ao grupo mantido com a dieta padrão, a inclusão das proteínas Cry1a12 e Cry8Ha1 na dieta não induziu alterações no peso seco relativo de nenhum dos órgãos internos e glândulas anexas avaliados. Os resultados obtidos reforçam os outros dados já apresentados, mostrando que, nas condições de ensaio realizadas, as proteínas recombinantes analisadas não apresentaram toxicidade. Já os animais que receberam a dieta aprotéica apresentaram maior peso relativo do intestino delgado, coração, rins e pulmões e atrofia do timo.

Tabela 6. Peso seco relativo dos órgãos internos dos ratos. Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) de órgãos tubulares e glândulas anexas do sistema digestório, do

coração, rins, pulmões e órgãos linfóides dos ratos submetidos a dietas controle (aprotéica e padrão) e experimentais (Cry1Ia12 e Cry8Ha1).

Órgãos	Dietas			
	Aprotéica	Padrão	Cry1Ia12	Cry8Ha1
Estômago	0,75 ± 0,05 ^a	0,64 ± 0,10 ^a	0,57 ± 0,04 ^a	0,59 ± 0,03 ^a
Intestino Delgado	2,96 ± 0,19 ^b	2,32 ± 0,30 ^a	2,36 ± 0,27 ^a	2,24 ± 0,14 ^a
Intestino Grosso	1,12 ± 0,20 ^a	1,04 ± 0,10 ^a	1,04 ± 0,08 ^a	1,05 ± 0,21 ^a
Fígado	4,70 ± 0,40 ^a	4,49 ± 0,40 ^a	4,41 ± 0,4 ^a	4,37 ± 0,4 ^a
Pâncreas	0,30 ± 0,05 ^a	0,35 ± 0,06 ^a	0,33 ± 0,08 ^a	0,31 ± 0,07 ^a
Coração	0,39 ± 0,03 ^b	0,31 ± 0,04 ^a	0,34 ± 0,02 ^a	0,32 ± 0,03 ^a
Rins	0,95 ± 0,08 ^b	0,69 ± 0,07 ^a	0,76 ± 0,11 ^a	0,74 ± 0,05 ^a
Pulmões	0,58 ± 0,06 ^b	0,47 ± 0,05 ^a	0,50 ± 0,07 ^{ab}	0,52 ± 0,03 ^{ab}
Timo	0,18 ± 0,05 ^b	0,28 ± 0,05 ^a	0,29 ± 0,04 ^a	0,27 ± 0,04 ^a
Baço	0,20 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^a

Letras iguais na horizontal referem-se a valores não significativamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

6.2.5 - Análises Histológicas

Nas análises histológicas do tecido do duodeno dos animais alimentados com as dietas experimentais contendo as toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 observou-se que a borda em escova formada por microvilosidades estava perfeitamente intacta, que o núcleo dos enterócitos está perfeitamente normal, e que não houve aumento das populações de células de defesa, assim ao visualizarmos a figura 15, veremos que as lamina dos animais experimentais não difere da lamina do animal controle, indicando que não houve nenhuma alteração das células do duodeno.

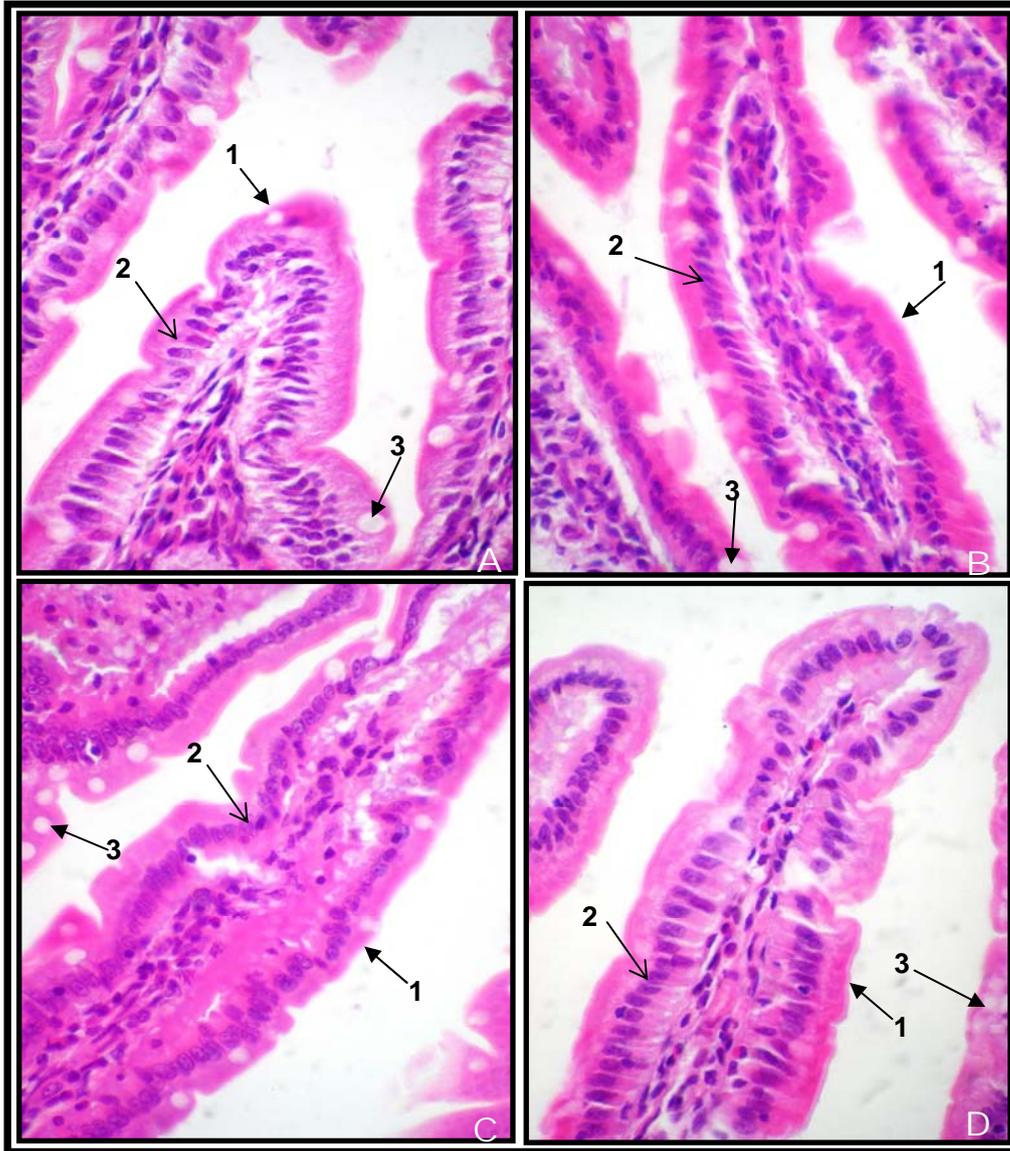


Figura 15. Cortes de duodeno de ratos alimentados com dietas padrão (à base de clara do ovo) e contendo as Toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 (aumentos de 600X). (A) Corte histológico do duodeno do rato alimentado com dieta contendo a toxina Cry1a12. (B) Corte histológico do duodeno do rato alimentado com dieta contendo a toxina Cry1a12. (C) Corte histológico do duodeno do rato alimentado com a dieta contendo clara de ovo. (D) corte histológico do duodeno do rato alimentado com a dieta contendo a toxina Cry8Ha1. **Seta 1.** Mostra que a borda formada por microvilosidade permanece intacta em todos os tratamentos. **Seta 2.** O núcleo dos enterócitos estão normais em todos os tratamentos. **Seta 3.** As células caliciformes estão no seu tamanho normal em todos os tratamentos. Os tecidos foram corados com hematoxilina-eosina.

6.2.6. Bioquímica Sanguínea

A concentração das proteínas séricas totais (Figura 16) foi mais baixa para o grupo aprotéico. Os animais que receberam as dietas contendo as proteínas Cry estudadas apresentaram concentrações de proteínas totais semelhantes ao do grupo contendo a dieta padrão, estando dentro, ou muito próximo, da faixa que é considerada normal para ratos (5,6 - 7,6 g/dL). Dentre as proteínas totais, foi avaliada, ainda, a concentração de albumina sérica (Figura 17). Essa proteína tem origem hapatocitária, constituindo-se em um bom indicador de deficiência hepática e quadro de desnutrição. Similarmente ao observado com as proteínas totais, os animais mantidos com as dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 apresentaram concentração de albumina sérica semelhante ao da dieta padrão. Como esperado, os animais submetidos à dieta aprotéica mostraram níveis mais baixos de albumina sérica, evidenciando o quadro de desnutrição.

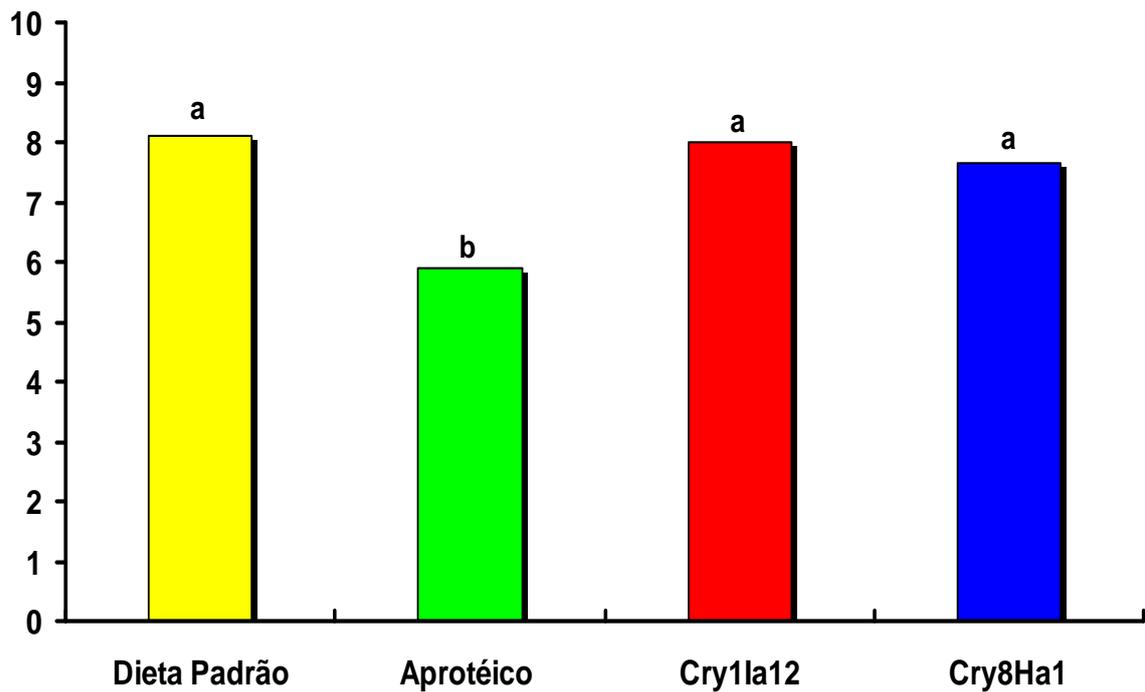


Figura 16. Concentração (g/dL) de proteínas séricas totais, em ratos ($n = 6$) submetidos às dietas contendo as proteínas Cry11a12 e Cry8Ha1, comparada com aquelas de animais mantidos com as dietas padrão e aprotéica. Letras iguais referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

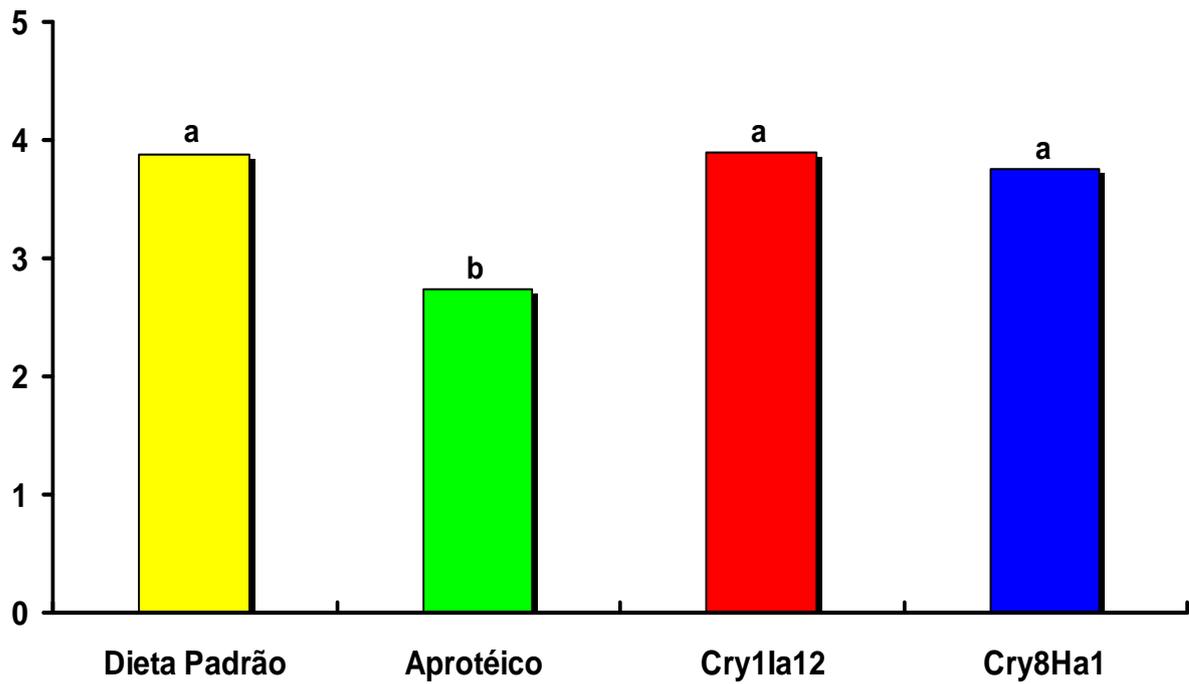


Figura 17. Concentração de albumina sérica (g/dL), em ratos ($n = 6$) submetidos às dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparada com aquelas de animais mantidos com as dietas padrão e aprotéica. Letras iguais referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

Como marcador renal foi feita a dosagem de uréia. Esse composto é o principal produto do catabolismo das proteínas e aminoácidos, tendo sua concentração sérica afetada pela dieta e estado de hidratação. Na determinação de sua concentração (Figura 18), foi observado que os animais à base das dietas contendo as toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 não apresentaram diferenças em relação ao grupo mantido com a dieta padrão. Já o grupo aprotéico apresentou um nível bem mais elevado de uréia, indicando um possível quadro de deficiência renal.

Na análise da atividade da fosfatase alcalina (Figura 19), alterações significativas não foram observadas entre os grupos submetidos às dietas contendo as proteínas teste e à dieta padrão. Apenas nos animais alimentados com a dieta aprotéica é que foi constatada uma diminuição na concentração dessa enzima, sinalizando, mais uma vez, um quadro de desnutrição.

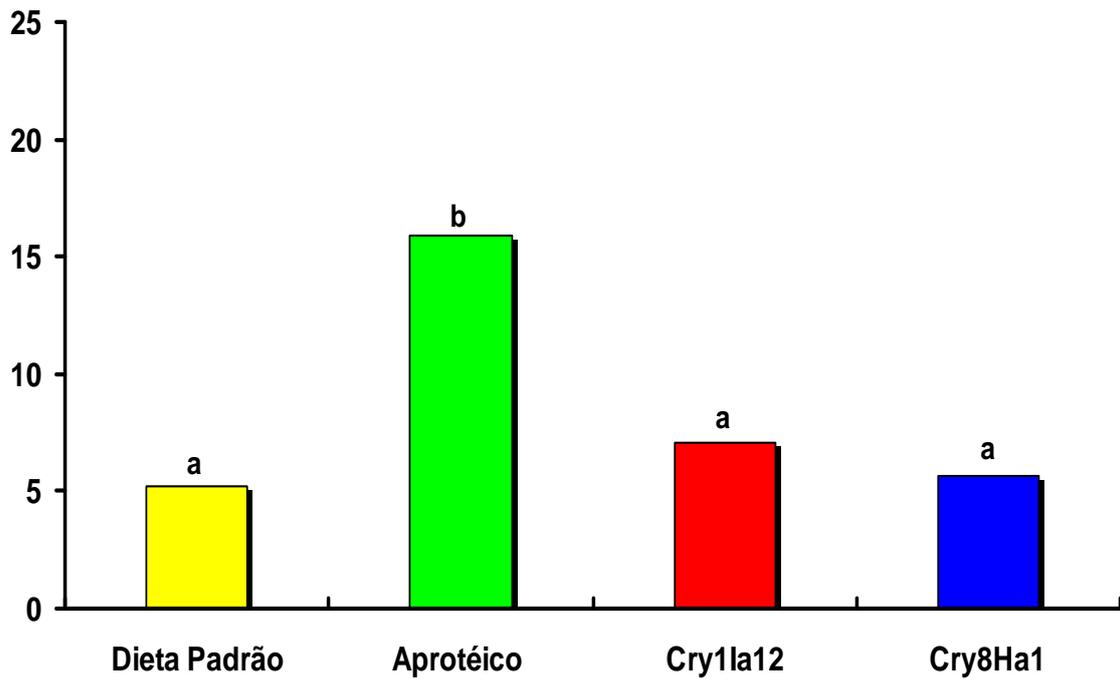


Figura 18. Níveis séricos (mg/dL) de uréia, em ratos ($n = 6$) submetidos às dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparada com aquelas de animais mantidos com as dietas padrão e aprotéica. Letras iguais referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

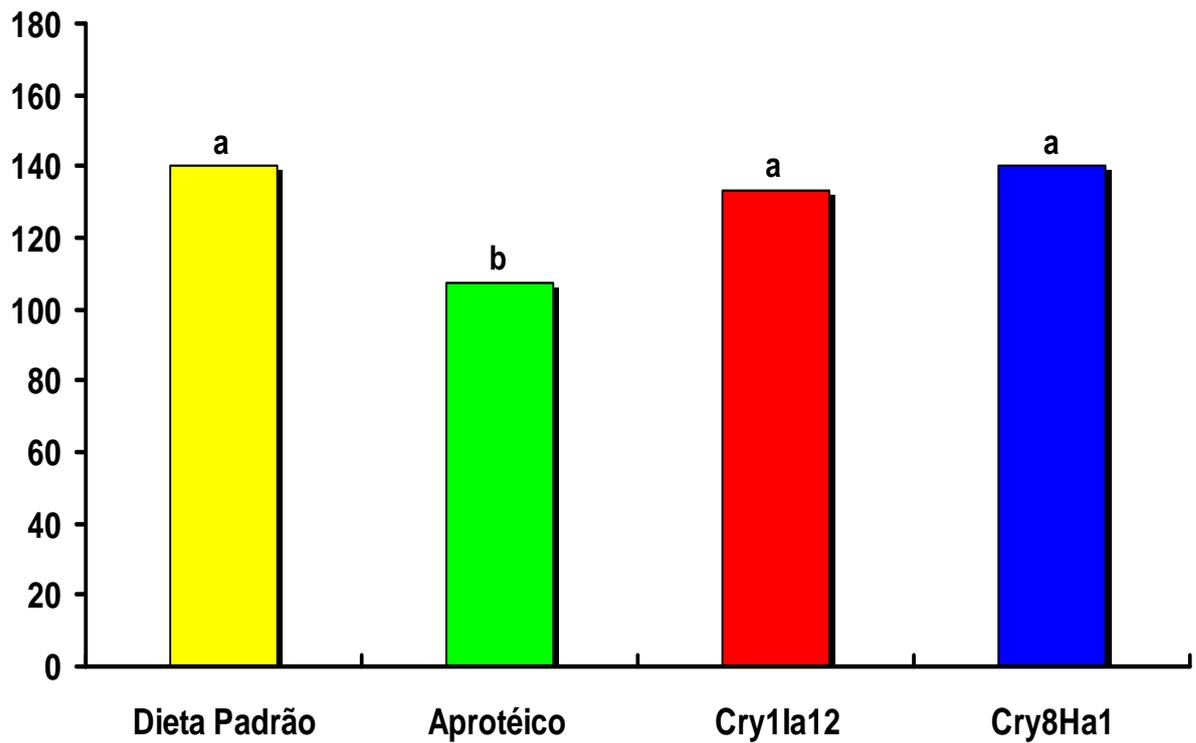


Figura 19. Níveis séricos de fosfatase alcalina (U/mL), em ratos ($n = 6$) submetidos às dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparada com aquelas de animais mantidos com as dietas padrão e aprotéica. Letras iguais referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

Como marcadores hepáticos, foram avaliadas as atividades da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) (Figuras 20 e 21). As dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 não induziram alterações nas atividades enzimáticas citadas, quando comparadas com a dieta padrão, caracterizando, provavelmente, uma integridade da função hepática.

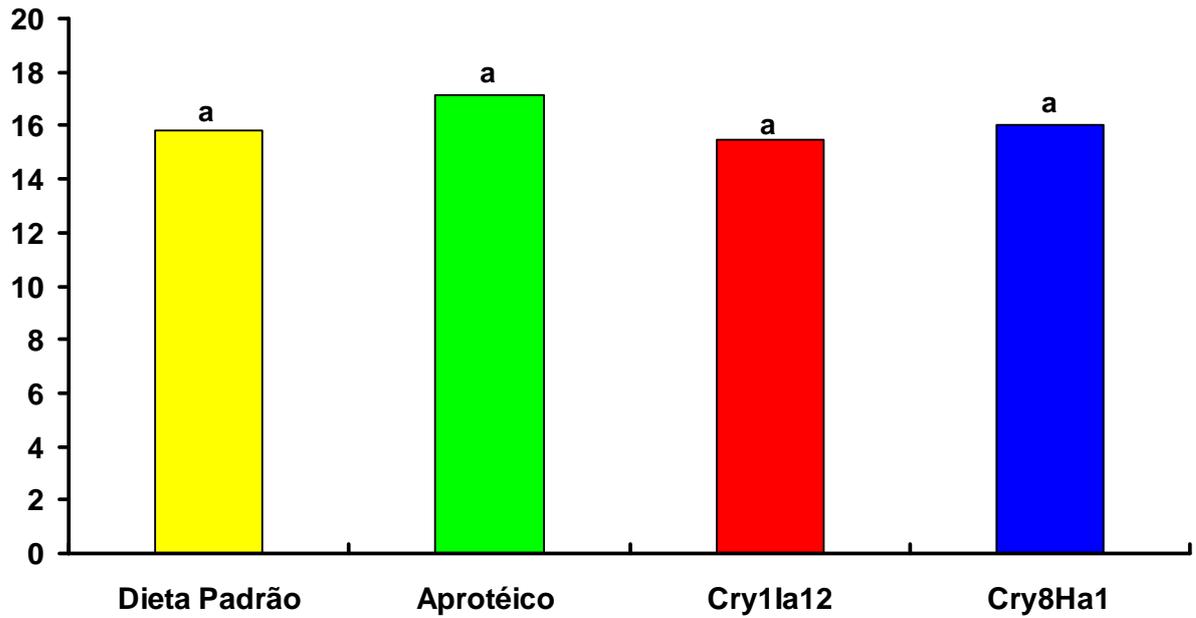


Figura 20. Níveis séricos (U/mL) da alanina aminotransferase (ALT), em ratos ($n = 6$) submetidos às dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparada com aquelas de animais mantidos com as dietas padrão e aprotéica. Letras iguais referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

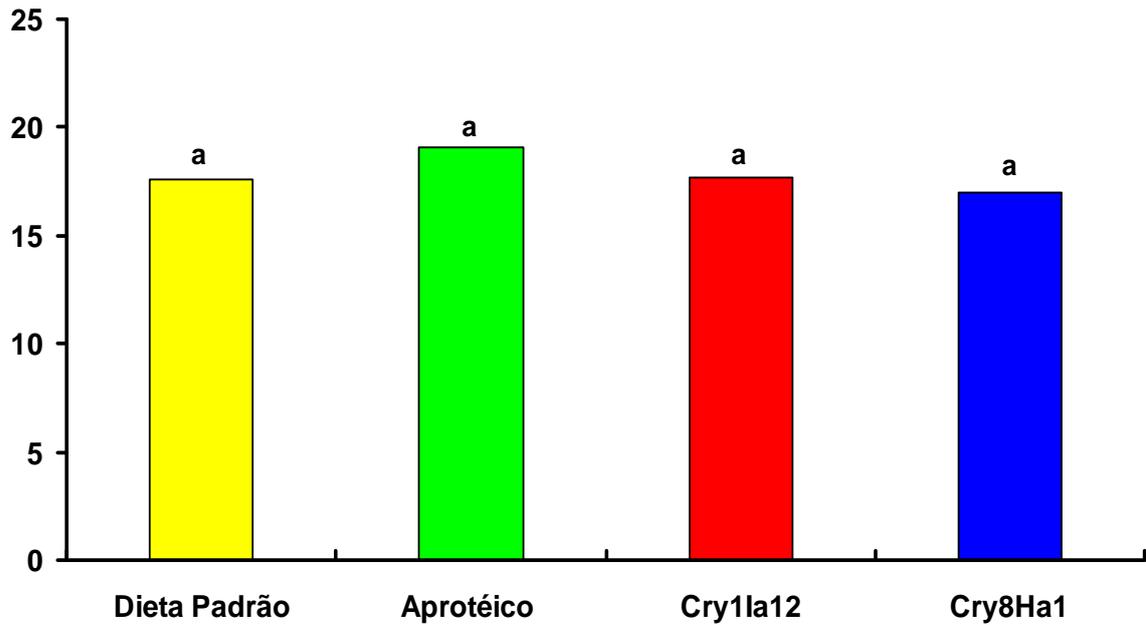


Figura 21. Níveis séricos (U/mL) da aspartato aminotransferase (AST), em ratos ($n = 6$) submetidos às dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, comparada com aquelas de animais mantidos com as dietas padrão e aprotéica. Letras iguais referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), teste de Tukey.

6.3. Avaliação da toxicidade aguda das proteínas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 por via oral (dose única)

A administração da proteína Cry1Ia12 ou Cry8Ha1, 12 mg dissolvidas em NaCl 0,15 M, livre de qualquer outro componente, não causou mortalidade dos animais, no período de 24 horas. Os animais entubados com as proteínas teste não apresentaram mudanças no comportamento quando comparados àqueles do grupo controle, que receberam apenas NaCl 0,15 M. Os animais permaneceram sob observação por uma semana e o quadro descrito foi mantido.

7 – DISCUSSÃO

Ao longo da última década, o grupo de pesquisa do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LIMPP), vem utilizando diversas estratégias moleculares visando o controle de insetos-praga de culturas de importância econômica. Várias têm sido as moléculas testadas, entre estas destacam-se as proteínas Cry (δ -endotoxinas), provenientes da bactéria Gram-positiva de solo *B. thuringiensis*. A estirpe de *B. thuringiensis* denominada S811 apresentou alta toxicidade sobre os insetos-praga *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*. Estudos preliminares mostraram que 91,6% das larvas de *A. grandis* e 95% das larvas neonatas de *S. frugiperda* foram controladas (mortas) em bioensaios seletivos com as culturas esporuladas (MAGALHÃES, 2006; GROSSI DE SÁ *et al.*, 2007).

Experimentos adicionais foram conduzidos no sentido de conhecer qual(is) molécula(s) da estirpe S811 possuía(m) atividade entomotóxica, tendo sido detectadas proteínas bioativas. Dessa forma, estudos voltados para o isolamento e análise dos genes responsáveis pela expressão dessas proteínas foram realizados pelo nosso grupo, tendo sido recém-isolados dois genes, denominados de gene *cry11a12* e *cry8Ha1* (MAGALHÃES, 2006; GROSSI DE SÁ *et al.*, 2007). A proteína Cry11a12 possui alta identidade (99%) e alta similaridade (99%) com as demais toxinas Cry11a depositadas em bancos de dados, existindo somente substituições nas posições 476 de A por G e 1719 de C por T, resultando em uma única substituição de Lys¹⁵⁹ por Arg no domínio I (localizado na segunda alfa-hélice), demonstrando que as seqüências do tipo Cry11a pouco diferem entre si. A toxina Cry8Ha1 mostra similaridade e identidade de 58% e 73%, respectivamente, com as demais toxinas Cry8 depositadas em bancos de dados, sendo considerada uma proteína distinta das demais. A comparação, entre si, das seqüências das toxinas Cry11a12 e Cry8Ha1 mostra que essas proteínas são bem diferentes (MAGALHÃES, 2006; GROSSI DE SÁ *et al.*, 2007). Uma vez analisados e caracterizados os genes *cry* responsáveis pela expressão das toxinas Cry11a12 e Cry8Ha1, estes foram introduzidos em plantas de algodão via tubo polínico, com o intuito de gerar resistência ao ataque de insetos-praga das ordens lepidóptera e coleóptera (SAMPAIO, 2007).

Para aprovação e liberação de uma cultivar transgênica no mercado, pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), é necessária a comprovação de sua segurança e a disponibilização de informações sobre os seus potenciais efeitos negativos. No que concerne ao registro de culturas modificadas com *B. thuringiensis* (Bt), são usados, na maioria das vezes, dados de toxinas Cry produzidas em *E. coli*, tendo sido realizados apenas alguns poucos estudos nos quais mamíferos foram alimentados com culturas transgênicas Bt, e seus efeitos monitorados com relação à sua segurança alimentar.

Diante disso, considerando que o LIMPP tem como uma de suas metas a inserção no mercado de uma nova cultivar de algodão transgênico mais resistente ao ataque de insetos-praga, expressando as proteínas heterólogas Cry8Ha1 e Cry1Ia12, tornou-se necessário a avaliação da toxicidade dessas proteínas por via oral, visto que o farelo de algodão, por ser uma excelente fonte protéica para diversos animais, é empregado na complementação de outras rações e que o óleo produzido a partir da semente de algodão é usado como produto alimentício e consumido por humanos. Entretanto é necessário notar que, estudos de biossegurança alimentar do óleo derivado do algodão Bt, tornam-se inúteis, pois o processo de refinamento remove as proteínas a níveis muito baixo de detecção (LOD; <0.1 ng/mg), como foi demonstrado por Dryzga *et al.*, (2007).

Assim, o presente trabalho foi realizado tendo como foco a avaliação da toxicidade, das proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 purificadas, por via oral dando ênfase aos seus efeitos agudos e sub-crônicos. Para isso, ratos em crescimento foram selecionados como modelo de mamíferos.

Para realização dos testes de toxicidade, era crucial a obtenção das proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 em quantidades satisfatórias, de modo a permitir uma avaliação segura. A proteína recombinante Cry1Ia12 foi obtida com sucesso no sistema heterólogo pET (*Escherichia coli*) e, após otimização da expressão, foi verificado que essa proteína se encontrava presente na fração solúvel do extrato celular e se mostrava ativa (Figura 5). Inicialmente, foi observado um grande acúmulo de proteína na forma de corpos de inclusão no interior da célula. Esse tipo de situação ocorre, geralmente, com proteínas de massa molecular alta e/ou quando os vetores de expressão possuem promotores muito fortes. Nesse último caso, os genes são transcritos em uma velocidade tão elevada, que a maquinaria das células não consegue realizar o dobramento completo e/ou correto das proteínas em tempo hábil (MARSTON, 1986). Conseqüentemente, as

proteínas expõem suas regiões hidrofóbicas, se associando intermolecularmente, precipitando dentro da célula, formando os chamados corpos de inclusão.

Existem vários métodos para solubilizar as proteínas dos corpos de inclusão. Para as toxinas Cry, os protocolos descrevem a utilização de tampões com pH extremamente alcalino, antecedida de uma grande quantidade de procedimentos experimentais, o que dificulta as condições e o progresso do trabalho (MAGALHÃES, 2006). No presente trabalho, optou-se pelo uso de lisozima, com o objetivo de aumentar a lise das bactérias recombinantes, como descrito por Sambrook *et al.* (1989). A razão para sua utilização advém do fato de sua atividade catalítica estar associada à hidrólise da ligação glicosídica $\beta(1 \rightarrow 4)$ ligando os monossacarídeos ácido *N*-acetilmurâmico (NAM) e *N*-acetilglucosamina (NAG), principais constituintes da parede celular bacteriana. Assim, foi obtido um aumento expressivo da toxina CryIIa12 na fração solúvel do extrato (Figura 5).

Após a expressão, foi necessário obter a proteína pura, processo esse bastante facilitado pela presença de uma “cauda” de poli-histidina na extremidade C-terminal das proteínas recombinantes. Esta “cauda” permite o uso de cromatografia de afinidade com metal imobilizado, onde metais de transição (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+}) podem coordenar alguns aminoácidos tais como histidina, cisteína e triptofano, através dos grupos doadores de elétrons nas cadeias laterais dos aminoácidos. Para que ocorra a interação, é necessária a presença de um agente quelante, o que permite a imobilização dos íons desejados. Nesse trabalho, foi utilizado como agente quelante o ácido nitrotriacético (NTA), acoplado a uma matriz de Sepharose CL-6B, através de um longo braço espaçador hidrofílico. Esta matriz foi capaz de assegurar a acessibilidade do metal para todos os centros de ligação disponíveis na proteína recombinante. Assim, em apenas um passo cromatográfico, foi possível separar as toxinas Cry do extrato protéico total de *E. coli*. Essa estratégia foi utilizada com sucesso na purificação de outras proteínas de interesse industrial e terapêutico, como a interleucina humana 1 (PATWARDHAN *et al.*, 1997), β -galactosidase e transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (VOSTERS *et al.*, 1992), demonstrando ser este um método universal de purificação aplicável para as mais distintas moléculas.

Para testar a atividade da toxina Cry8Ha1, o gene *cry8Ha1* também foi clonado no vetor de expressão pET (*E. coli*). A obtenção de Cry8Ha1 foi bastante simples, uma vez que essa proteína não formou corpos de inclusão em quantidade elevada, englobando uma etapa de lise e uma outra de purificação, da mesma forma que

foi procedido com a toxina Cry1Ia12. Assim, as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 foram obtidas e armazenadas para serem utilizadas nos testes de toxicidade.

Embora a grande maioria dos trabalhos envolvendo a avaliação dos efeitos das proteínas Cry, presentes em culturas Bt, seja baseada no teste de equivalência, tem sido observado que a análise dos efeitos da proteína recombinante pura, na concentração de sua expressão na planta GM, é fundamental e, mesmo mais apropriada, para testar a segurança da cultura GM. A razão para isso é que esse procedimento permitiria uma avaliação mais detalhada das diferenças observadas entre o grupo teste alimentado com a proteína heteróloga e àquele submetido a uma dieta isenta da proteína, aumentando, dessa forma, a especificidade do estudo na detecção dos efeitos relacionados com o composto em questão. Os resultados obtidos poderiam ser diretamente correlacionados com a proteína pura. No entanto, é consenso que estudos posteriores são necessários para complementar essa avaliação e garantir a biossegurança alimentar; dessa vez, envolvendo a planta transgênica.

No presente trabalho, uma primeira avaliação da toxicidade das proteínas recombinantes foi programada para avaliar os seus efeitos sub-crônicos, quando administradas em dietas a ratos em crescimento, durante 10 dias. Os recentes trabalhos envolvendo a análise de toxicidade de uma variedade transgênica é realizada durante 90 dias, como o presente trabalhos, As toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 foram incluídas nas dietas dos animais, na proporção de 100 mg/Kg de dieta, representando 0,1% da proteína total, superestimando assim, o nível de expressão das proteínas heterólogas no algodão a ser transformado, já que os níveis de expressão de uma proteína heteróloga numa planta geneticamente modificada varia entre 0,01 a 0,1% da sua expressão em relação proteína total (KILIC e AKAY, 2008). Esse valor foi maior do que o utilizado para a toxina Cry1Ab, presente no arroz transgênico, que foi de aproximadamente 9 mg/Kg de dieta (SCHRODER *et al.*, 2007), do que a dieta utilizada por Noteborn *et al.* (1995) em ratos, que continha 10% do liofilizado do extrato do tomate transgênico (40 ng Cry1Ab/mg de proteína total no liofilizado), e bem superior em relação a dieta contendo farelo da semente de algodão, que continha 0,28 mg Cry1F/Kg de Dieta e 0,096mg Cry1Ac/Kg de Dieta (DRYZGA *et al.*, 2007), em todos os casos tendo sido os experimentos realizados com ratos. Como proteína padrão ou proteína de referência, compondo a dieta padrão, foi usada albumina da clara do ovo (“egg white”), por ser de alto valor biológico, isto é, por conter todos os aminoácidos essenciais em quantidades e proporções ideais para atender às necessidades orgânicas. Essa proteína tem sido usada

há várias décadas como controle, nas mais diferentes abordagens, devida a quase total ausência de efeitos colaterais associados a ela. A sua utilização como proteína controle se sobressai em testes de avaliação dos efeitos antinutricionais e/ou tóxicos de outros componentes de origem protéica (VASCONCELOS *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Com a realização do ensaio biológico, foi observado que as taxas de crescimento dos animais submetidos às dietas contendo as toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 foram similares à dos animais mantidos com a dieta padrão (Figura 11). Isso pode ser explicado pela inexistência de diferenças significativas no ganho de peso, ingestão de dieta e conversão alimentar entre os diferentes tratamentos envolvendo a dieta padrão e as dietas teste. Esses resultados são comparáveis aos apresentados por Schroder *et al.* (2007), que verificaram curvas de crescimento semelhantes para ratos alimentados com arroz transgênico expressando a toxina Cry1Ab e com arroz convencional. Noteborn *et al.* (1995) e Dryzga *et al.* (2007) observaram, também, a mesma tendência em ratos alimentados com a toxina Cry1Ab.

Há vários dados centrados em estudos de avaliação da toxicidade de toxinas Cry, mostrando que estas não provocam efeitos adversos significativos no peso de animais experimentais, nem mesmo induzem comportamentos diferenciados que possam ser detectados por meio de observações clínicas. Isso conduz para uma forte indicação de que essas toxinas são inofensivas ou não tóxicas para mamíferos, incluindo o homem. A ausência de efeitos tóxicos em mamíferos tem sido creditada à acidificação do estômago e a falta de sítios de ligação específicos para as toxinas Cry no intestino (McCLINTOCK *et al.*, 1995). A esse respeito, tem sido verificada a degradação rápida dessas proteínas no fluido gástrico (cerca de 90% em 2 minutos). Isto significa que, embora no fluido intestinal a degradação das proteínas Cry seja mais lenta, esse fato não tem grande importância no sistema natural, pois uma vez ingeridas, estas sofrem primeiramente a ação da pepsina no estômago, sendo quase que completamente digeridas (GILL *et al.*, 1992; ENGLISH e SLATIN, 1992). Assim sendo, as mesmas terão um papel muito maior na disponibilização de aminoácidos do que na indução de outros efeitos.

Um outro parâmetro considerado foi o balanço de nitrogênio (Tabela 4). A relação entre a dieta consumida e a excreção fecal ($F/D \times 100$) e os valores relativos de excreção de nitrogênio ($FN/N \times 100$) foram semelhantes ao verificado com a dieta padrão. Esses dados indicam que a inclusão das toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 na dieta

não foram capazes de interferir no aproveitamento das toxinas, tendo havido uma boa retenção de nitrogênio. As taxas elevadas de absorção e de utilização do nitrogênio observadas com uma proteína de alta qualidade, como é o caso da albumina da clara do ovo, são decorrentes não apenas de seu excelente perfil aminoacídico, mas, também, da ausência de fatores antinutricionais e/ou tóxicos e de sua conformação estrutural, permitindo a sua hidrólise completa e, conseqüente, absorção de aminoácidos.

Para confirmar a biodisponibilidade dos aminoácidos, outros parâmetros nutricionais, compreendendo digestibilidade, utilização líquida de proteína (NPU) e valor biológico, foram avaliados (Tabela 5). Para todos eles, os valores determinados para os grupos submetidos às dietas contendo as toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 não divergiram significativamente daqueles verificados com a dieta padrão. Quase todos os parâmetros foram superiores ou muito próximos a 90%, reforçando a natureza não tóxica ou mesmo antinutricional das proteínas analisadas, pelo menos para ratos. A digestibilidade inadequada, não sendo o caso das proteínas avaliadas no presente trabalho, é um dos principais fatores que comprometem a eficiência da utilização líquida das proteínas da dieta e, por conseguinte, o seu valor biológico. Quando determinadas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo por microorganismos do intestino grosso (SGARBIERI e WHITAKER, 1982; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). Assim, a avaliação desse parâmetro foi oriunda do questionamento se haveria possibilidade das proteínas que não foram digeridas no estômago se ligarem à mucosa intestinal dos ratos, causando alterações relacionadas àquelas verificadas nos animais suscetíveis as proteínas Cry, dentre elas a inativação do sistema que mantém o gradiente de pH (WOLFERSBERGER, 1992) e a citólise osmótica (KNOWLES, 1987). Essa ligação poderia, ainda, resultar na sua internalização e, então, no aparecimento de outros efeitos de natureza sistêmica, tais como alterações de alguns órgãos internos, como tem sido relatado para diversas lectinas (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004).

Os efeitos das toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 sobre o peso seco relativo de órgãos internos e glândulas anexas dos ratos foram, também, avaliados neste trabalho (Tabela 6), tendo em vista a existência de alterações significativas, particularmente no intestino delgado e pâncreas, oriundas do consumo de algumas proteínas, como exemplos lectinas e inibidores de tripsina (VASCONCELOS *et al.*, 2001; CLARKE e

WISEMAN, 2005). Ao todo, foram dez órgãos e glândulas anexadas analisados, compreendendo estômago, intestinos delgado e grosso, fígado, pâncreas, coração, rins, pulmões, timo e baço. Nenhuma diferença significativa foi detectada quando comparados os pesos de órgãos dos animais mantidos com as dietas teste e com a dieta padrão. Os animais que receberam a dieta aprotéica apresentaram aumento relativo de alguns órgãos como intestino delgado, coração, rins e pulmões, provavelmente, numa tentativa de preservação desses órgãos. Atrofia do timo também foi detectada, devendo estar associada ao estado de desnutrição do animal. Alterações no peso de órgãos também não foram detectadas em ratos alimentados com algodão transgênico, expressando as proteínas entomotóxicas Cry1F e Cry1Ac (DRYZGA *et al.*, 2007). A inclusão da proteína Cry1Ab em dietas para ratos e bovinos também não trouxe mudanças no peso de órgãos (NOTEBORN *et al.*, 1995; SHIMADA *et al.*, 2003).

Além dos pesos de órgãos internos, análises mais minuciosas têm sido realizadas, não tendo sido evidenciado, em vários casos, o comprometimento de órgãos-chave de animais, resultante do consumo de transgênicos. Um desses estudos envolveu o consumo de milho modificado geneticamente (MON 810), contendo o gene que codifica a proteína Cry1Ab, que o tornou resistente ao inseto peste *Ostrinia nubilalis*. Os resultados obtidos mostraram que o consumo de MON 810 não induziu alterações na estrutura das membranas de células hepáticas e nem em seu aparato enzimático, envolvido com a biotransformação de corpos estranhos intracelulares (TUTE'IAN *et al.*, 2001). Experimentos adicionais mostraram, ainda, que a administração de MON 810 a ratos de seis meses de idade não causou efeitos adversos sobre a peroxidação lipídica e nem na atividade enzimática do sistema antioxidante em eritrócitos, plasma sanguíneo e fígado (CHIBURAEV *et al.*, 2003).

Diferentemente do que é verificado em larvas de insetos susceptíveis, isto é, destruição das células colunares (GARCIA-ROBLES *et al.*, 2001), alterações nas criptas intestinais de ratos submetidos a dietas contendo Cry1Ia12 e Cry8Ha1 não foram identificadas, não havendo aumento das células de defesa tanto imediata como imune, a borda em escova estava intacta e o núcleo do eritrócitos estava perfeitamente normal, além de não haver, também, destruição nem aumento do número de células caliciformes por campo. Esses dados são indicativos de uma não agressão à mucosa intestinal, resultante do consumo dessas proteínas. Em adição, foi verificado que as toxinas Cry

não interagiram com nenhuma região dentro do trato digestório, incluindo o esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo e cólon (NOTEBORN *et al.*, 1995).

Nas análises relacionadas à bioquímica sanguínea, com exceção do grupo aprotéico, cujas alterações devem estar relacionadas à desnutrição protéica, diferenças significativas não foram detectadas nos animais submetidos à dieta padrão e às dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 (Figuras 16 a 21). O fato da concentração de albumina sérica nos animais que receberam as toxinas Cry ter se mantido semelhante aos submetidos à dieta padrão é importante, pois essa proteína é crucial para manutenção da pressão osmótica coloidal e transporte e armazenamento de vários compostos do sangue como a bilirrubina, ácidos graxos, tiroxina, cortisol, aldosterona e cálcio (GONZALEZ e SILVA, 2003). Um outro dado relevante diz respeito ao observado para a concentração de fosfatase alcalina, indicando que a ingestão das toxinas Cry não causou danos às mucosas. A concentração elevada dessa enzima, que não foi o caso, está relacionada a crises gastrointestinais, provenientes do comprometimento da mucosa e, também, de distúrbios hepáticos (GONZALEZ e SILVA, 2003). O baixo nível de uréia também reforça um quadro de não intoxicação, ainda que sua dosagem no sangue avalie apenas grosseiramente o funcionamento renal. A razão disso é que além dos distúrbios primários, a uréia pode estar aumentada na azotemia pré-renal, quando a oferta de sangue ao rim é insuficiente, por exemplo, nos casos de choque e desidratação, levando à diminuição da filtração glomerular (GONZALEZ e SILVA, 2003). As concentrações detectadas de aminotransferases corroboram, bastante, com o quadro de não intoxicação até agora descrito, caracterizando uma integridade da função hepática. A aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT) denotam, muitas vezes, desordens hepatocelulares. Em vários casos, níveis elevados dessas enzimas são observados quando existem injúrias, por exemplo, infecções ou toxinas, que resultam em lesão da membrana celular, com posterior perda de componentes citoplasmáticos e mitocondriais para o plasma (GONZALEZ e SILVA, 2003).

Ao longo dos dez dias de experimento, cada animal consumiu em torno de 12 mg das toxinas Cry1Ia12 ou Cry8Ha1, incluídas em dietas, compreendendo 0,1% da proteína total. Nesse caso, os animais não apresentaram qualquer efeito que pudesse levantar suspeita de toxicidade dessas proteínas. Diante disso, surgiu o questionamento se essa quantidade consumida por cada animal causaria uma toxicidade aguda, caso

fosse administrada de uma única vez. Assim foi feito. Além de terem sido administradas em dose única, as proteínas Cry foram apenas dissolvidas em NaCl 0,15 M, diferentemente do primeiro experimento em que elas estavam juntas com outros componentes da dieta, inclusive proteínas. A administração foi feita por entubação, usando uma sonda orogástrica, para assegurar que o animal havia consumido as 12 mg de proteína. A taxa de mortalidade dos ratos foi zero, no período de 24 horas, não apresentando qualquer mudança de comportamento. Os animais continuaram sob observação por vários dias, não tendo havido alteração do quadro descrito. A quantidade consumida das proteínas Cry1Ia12 ou Cry8Ha1 foi superior à expressão de outras proteínas Cry em plantas geneticamente modificadas. Por exemplo, os níveis mais altos da proteína Cry1Ab no milho transgênico MON 810 foram detectados em folhas, cujos valores ficaram situados na faixa de 4,91 a 12,5 mg/Kg de peso fresco. Em plantas inteiras, os valores ficaram entre 3,34 a 4,88 mg/Kg e em grãos entre 0,31 a 0,57 mg/Kg de peso fresco (SANDERS *et al.*, 1998). Esses números são bem menores quando relacionados às proteínas totais, correspondendo nas folhas a 10,34 ng/mg de proteína total, na planta inteira 4,65 ng/mg de proteína total e nos grãos 0,19 a 0,39 ng/mg de proteína total (MENDELSON *et al.*, 2003). Já a proteína Cry1Ac, presente em treze variedades comerciais de algodão (DP 20B; DP50B; NuCOTN 33B; DP428B; DP 409B/RR; DP 422B/RR; DP451B/RR; DP458B/RR, variedades da Delta & Pineland Co., Scoot, MS; ST 4691B; ST 4892B/RR, variedade da Stoneville Pedrigree – Memphis, TN; SG 125B/RR, Sure-Grow - Delta & Pineland Co., Scoot, MS; 1218B/RR e 2280B/RR, Paymaster - Delta & Pineland Co., Scott, MS), apresentou um valor médio de expressão de 1,5 mg/Kg de proteína Cry1Ac (ADAMCZYK e SUMERFORD, 2001).

Os dados obtidos mostram, claramente, a não toxicidade das proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 para ratos, por via oral, sendo suficientemente seguros a respeito de sua segurança alimentar, corroborando com vários outros estudos centrados na não toxicidade das proteínas de Cry em mamíferos (SJOBLAD *et al.*, 1992; BETZ *et al.*, 2000; SIEGEL, 2001; FEDERICI, 2002; HARD e TERRON, 2004; DOULL, *et al.*, 2007).

8 – CONCLUSÃO

As proteínas entomotóxicas de *B. thuringiensis* Cry1Ia12 e Cry8Ha1, quando incluídas em dieta para ratos em crescimento, na proporção de 100 mg/Kg de dieta ou 0,1% da proteína total, e ofertadas por dez dias, não causaram efeitos antinutricionais e/ou tóxicos nos animais. Quando essas proteínas foram administradas por via oral em dose única (12 mg), calculada com base na quantidade total ingerida no experimento sub-crônico, os animais não apresentaram toxicidade aguda. Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam o potencial biotecnológico das proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, contribuindo com informações relevantes que viabilizam o seu uso como ferramentas eficazes e seguras no controle de pragas importantes da cultura de algodão.

9 – PERSPECTIVAS

- Análise da Alergenicidade das toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 em mamíferos.
- Análise da segurança alimentar em 90 dias do algodão geneticamente modificado, contendo as toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1, em mamíferos.

10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZYK, J. J. JR., SUMERFORD, D. V. Potential factors impacting season-long expression of Cry1Ac in 13 commercial varieties of Bollgard® cotton. **Journal of Insect Science**, v. 6, p. 1-13, 2001.

AGBIOS GM DATABASE. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php>> Acesso em: 25 de Março 2008.

ALTIERI, M. A., ROSSET, P. Ten reasons why biotechnology will not ensure food security, protect the environment and reduce poverty in the developing world. **Agbios**. v. 2, p. 155-162, 1999.

ANZFA (AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD AUTHORITY). GM foods and the consumer – ANZFA's safety assessment process for genetically modified foods. ANZFA Occasional Paper Series. 2000. Disponível em www.anzfa.gov. Acessado em 10 de fevereiro 2008.

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

ARSHAD, S. H., MALMBERG, E., KRAPF, K., AND HIDE, D. W. Clinical and immunological characteristics of Brazil nut allergy. **Clinical Experimental Allergy**, v. 21, p. 373–376, 1991.

BAETHGEN, W. E., ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digest. **Soil Science Plant Analysis**, v. 20, p. 961-969, 1989.

BARTON, K. A., WHITELEY, H. R., YANG, N. S. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**. v. 85, p. 1103–1109, 1987.

BEARD, P. M., DANIELS, M. J., HENDERSON, D., PIRIE, A., RUDGE, K., BUXTON, D., RHIND, S., GREIG, A., HUTCHINGS, M. R., MCKENDRICK, I., STEVENSON, K., SHARP, J. M. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. **J. Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1517–1521, 2001.

BENINTENDE, G., MÁRQUEZ, A. M. Bactérias entomopatógenas. In: LECUANA, R. (org.). **Microorganismos patógenos empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga**. Capítulo 4: Bacterias Entomopatógenas, p. 61-65. 1996.

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

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BORÉM, A., SANTOS, F.R. Biotecnologia simplificada. 1ª. ed. Ed Univ. Fed. Viçosa, 2001. 249p.

BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, D., HARKEY, M. A., KIM, M.-K., BREVER, D., BAUER, L. S. The insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* spp. *Thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 162-173, 1995.

BRAVO, A., GÓMEZ, I., CONDE, J., MUÑOZ-GARAY, C., SÁNCHEZ, J., MIRANDA, R., ZHUANG, M., GILL, S., SÓBERÓN, S. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. **Biochemistry**, v. 43, p. 166-174, 2004.

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

BRAVO, A., SARAIBA, S., LOPES, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, M., LINA, L., VILLALOBOS, F. J., PENA, G., NUNEZ-VALDEZ, M. E., SOBERON, M., QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A., JANSENS, S., PEFFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of invertebrate pathology**, v. 60, p. 237-246, 1992.

BRITO, A. S. Toxicidade Aguda (Dose Simples). **Manual de Ensaios Toxicológicos *in vivo***. Campinas-SP: Editora da UNICAMP, cap. 1, pp. 15-22, 1994.

CHATTOPADHYAY, A., BHATNAGAR, N. B., BHATNAGAR, R. Bacterial. Insecticidal Toxins. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, p. 33–54, 2004.

CHIBURAEV, V. I., FOKIN, M. V., TSELYKOVSKAYA, N. Y. U., SHASHINA, E. A. Examining the antioxidative status in the toxicological and hygienic assessment of genetically modified maize types. **Gigiena I Saitariya**, v. 6, p. 18-79, 2003.

CHRISTOU, P., CAPELL, T., KOHLI, A., GATEHOUSE, J.A., GATEHOUSE, A.M. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Science**, v.11, p. 302-308, 2006.

CLARKE, E., WISEMAN, J. Effects of variability in trypsin inhibitor content of soya bean meals on true and apparent ileal digestibility of amino acids and pancreas size in broiler chicks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 121, p. 125-138, 2005.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. São Paulo, 1991. Disponível em: www.cobea.org.br. Acesso em: 23 dez. 2007.

COTTON ADVISORY BOARD. Disponível em <<http://www.apparel.indiamart.com>> Acesso em: 30 de Março 2008.

CRICKMORE N., ZEIGLER D. R., FEITELSON J., SCHNEPF E., VAN RIE J., LERECLUS D., BAUM J., DEAN D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 62, p. 807-813, 1998.

CTNBIO – COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Legislação e Documentos. www.ctnbio.gov.br. Acesso em: 10 abr. 2008

DEARMAN, R. J., KIMBER, I. Determination of protein allergenicity: studies in mice. **Toxicology letters**. v. 12 p. 181-186, 2001.

DE JONGE, J.D., KNIPPELS, L.M.J., EZENDAM, J., ODINK, J., PENNINKS, A.H. AND VAN LOVEREN, H. The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats. **Methods**, v. 41, p. 99-111, 2006.

DONALDSON, L., MAY, R. Health implications of genetically modified foods. 2000. Site of Health. Disponível: www.doh.gov.uk/gmfood.htm. Acesso: 12 de Março 2008.

DOULL, J., GAYLOR, D., GREIM, H. A., LOVELL, D. P., LYNCH, B., MUNRO, I.C. Report of an Expert Panel on the reanalysis by Séralini et al. (2007) of a 90-day study conducted by Monsanto in support of the safety of a genetically modified corn variety (MON 863). **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2073–2085, 2007.

DOUMAS, B. T., BAYSE, D. D., CARTER, R. J., PETERS JR, T., SCHAFFER, R. A. candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. **Clinical Chemistry**. v. 27, p. 1642-1650, 1981.

DRYZGA, M. D., YANO, B. L., ANDRUS, A. K., MATTSSON, J. L. Evaluation of the safety and nutritional equivalence of a genetically modified cottonseed meal in a 90-day dietary toxicity study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1940 – 2004, 2007.

EC, 2002. Policy areas: the directive on dangerous substances. European Commission, Brussels. http://ec.europa.eu/environment/dansub/home_en.htm. Acesso em 20 de fevereiro 2008.

EFSA, 2006a. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. **The EFSA Journal**, v. 99, p. 1-100.

EFSA, 2007b. Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safe use of the nptII antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa>. Acessado em: 14 de fevereiro de 2008.

ENGLISH, L., SLATIN, S. L. Mode of action of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v. 22, p. 1-7, 1992.

ENTRANSFOOD. Safety Assessment, Detection and Traceability and Societal Aspects of GM Foods. **Food and Chemical Toxicology**, v, 42 p. 1065-1069, 2004.

FAO. The state of food and agriculture 2003–2004. Agricultural Biotechnology: Meeting the needs of the poor? Food and Agriculture Organization. Rome: [s.n.], 2004. Disponível em: < <http://www.fao.org/DOCREP/006/Y5160E/Y5160E00.HTM> >. Acesso em 15 jun. 2004.

FEDERICI, B. **Case study: Bt crops**. In: Atherton, K. (Ed.), *Genetically Modified Crops, Assessing Safety*. Taylor and Francis, London. 2002.
FISCHHOFF, D. A., BOWDISH, K. S., PERLAK, F. J. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biology-Technology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

FONTES, E.M.G. Biossegurança de biotecnologias: breve histórico. 1998. Disponível em: <www.met.gov.br/ctnbio/>. Acesso em: 4 nov. 2007.

GARCIA-ROBLES, I., SÁNCHEZ, J., GRUPPE, A., MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C., RAUSSEL, C., REAL, M. D., BRAVO, A. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 in hymenopteran forest pests. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v. 3, p. 849-56, 2001.

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

GÓMEZ, I., SÁNCHEZ, J., MIRANDA, R., BRAVO, A., SOBERÓN, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters**, v. 513, p.242-246, 2002.

GONZÁLEZ, F. H. D., SILVA, S. C. Perfil Bioquímico Sanguíneo. In: Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2003.

GROCHULSKI, P., MASSON, L., BORISOVA, S., PUSZTAI-CAREY, M., SCHWARTZ, J., BROUSSEAU, R., CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**. v. 254 p. 447- 464, 1995.

GROSSI-DE-SA, M. F., QUEZADO, M., SILVA, M. S., DIAS, S. C., NAKASU, E. Y., BRUNETTA, P. S. F., OLIVEIRA, G. R., OLIVEIRA NETO, O. B., SOARES, L. H. B., AYUB, M. A. Z., SIQUEIRA, H. A., FIGUEIRA, E. L. Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a CryIIa-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 40, p. 773-782, 2007.

GROSSI-DE-SA, M.F., GIBAND, M. Biotecnologia no melhoramento: Perspectivas futuras. In: Moresco, E. (Org.). *Algodão - Pesquisas e Resultados para o campo*. 1 ed. Cuiabá, v. I, p. 286-303, 2006.

HANSEN, B. M., SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSENLE ROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, cap. 3, p. 41-64, 2000.

HARD, G., TERRON, A. Retrospective Evaluation of Renal Tissues and data from Monsanto Company Study CV-200-260 (MSL 18175): A 13-Week Rat Feeding Study with MON 863 corn. Monsanto Company (Unpublished report). **Pathology Peer Review**, 003-RS-04, 2004.

HARVEY, W. R. Physiology of V-ATPases. **Journal Experimental Biology**, v. 172, p. 1-17, 1992.

HOFMANN, C., VANDERBRUGGEN, H., HOFTE, H., VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brushborder membrane of the insect membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

HOFTE, H., WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**, v.53, p. 242-255, 1989.

HUGGETT, A. C., VERSCHUREN, P. M. The safety assurance of functional foods. **Nutrition Reviews**, v.5, p. 132-139, 1996.

IFT (THE INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY). Benefits and concerns associated with recombinant DNA biotechnology-derived foods Expert Report on Biotechnology and foods. Food Technology and Foods. Food Technology, v.54, p.61-80 2000a.

IFT (THE INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY). Human food safety evaluation of rDNA biotechnology-derived foods. Expert Report on Biotechnology and foods. Food Technology and Foods. Food Technology, v.54, p.53-61, 2000b.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief n° 38, 2007. ISAAA: Ithaca, NY. Disponível em <<http://www.isaaa.org>> Acesso em: Março 2008.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief n° 36, 2006. ISAAA: Ithaca, NY. Disponível em <<http://www.isaaa.org>> Acesso em: Dezembro 2006.

JAMES, C. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2005. ISAAA Briefs No. 34. ISAAA: Ithaca, NY. 2005.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2004. ISAAA Briefs No. 33. ISAAA, Ithaca, New York, 2004.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief n° 31, 2002. ISAAA, Ithaca, New York, 2002.

JOHNSON, D. E., OPPERT, B., MCGAUGHEY, W. H. Spore coat synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for Indianmeal moth. **Curr Microbiol.** v. 36, p. 278–282, 1998.

KILIC, A., AKAY, M. T. A three generation study with genetically modified Bt corn in rats: Biochemical and histopathological investigation. **Food and Chemical Toxicology.** v. 46, p.1164–1170, 2008.

KNIGHT, P. J., CRICKMORE, N., ELLAR, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Molecular Microbiology.** v. 3, p. 429–436, 1994.

KNOWLES, B. H., ELLAR, D. J. Colloid-Osmotic Lysis Is a General Feature of the Mechanism of Action of *Bacillus-Thuringiensis* Delta-Endotoxins with Different Insect Specificity. **Biochimica et Biophysical Acta.** v. 924, p. 509-518, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, M. K., YOU, T. H., YOUNG, B. A., COTRILL, J. A., VALAITIS, A. P., DEAN, D. H. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 62, p. 2845–2849, 1996.

MAGALHÃES, Q. M. **Toxinas Cry: Perspectivas para obtenção de algodão transgênico brasileiro.** Dissertação de Mestrado. UFRGS. 2006.

MARSTON. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *E. coli*. **Biochemical,** v. 240, p. 1-12, 1986.

McCLINTOCK, J. T., SCHAFFER, C. R., SJOBLAD, R. D. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. **Journal of Pest Science**, v. 45, p. 95–105, 1995.

MENDELSON, M., KOUGH, J., VAITUZIS, Z., MATTEWS, K. Are Bt crops safe? **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1003-1009, 2003.

METCALFE, D. D., ASTWOOD, J. D., TOWNSEND, R., SAMPSON, H. A., TAYLOR, S. L., FUCHS, R. L. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, p. 165–186, 1996.

MILLER, D. S., BENDER, A. C. The determination of net utilization of protein by shostened method. **British Journal of Nutrition**, v. 9, p. 382-383, 1955.

NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Plantas Transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar. *In*: SIMPÓSIO SUL-BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO: HISTÓRIA, CIÊNCIA E ARTE, 2000, Florianópolis.

NOTEBORN, H. P. J. M., BIENENMANN-PLOUM, M. E., VAN DEN BERG, J. H. J., ALINK, G. M., ZOLLA, L., REYNAERTS, A., PENSA, M., KUIPER, H. A. Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein CryIA(b) expressed in transgenic tomatoes. **ACS Symposium Series**, v. 605, p. 134–147, 1995.

OECD, 2007a. Series on the Safety of Novel Food and feed No. 15. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of the Cultivated Mushroom *Agaricus Bisporus*: Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Toxicants. Organization for Economic Cooperation and Development. OECD, Paris.

OECD, 2007b. Series on the Safety of Novel Food and feed No. 16. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Sunflower: Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Toxicants. Organization for Economic Cooperation and Development. OECD, Paris.

OCDE, 1998. Report on the OCDE workshop on the toxicological and nutritional testing of novel foods. Paris. 48 p. Disponível em: www.oecd.org/subject/biotech/. Acessado em: 20 de março 2008.

OGA S. Fundamentos de toxicologia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 01-77.

OLIVEIRA, J. T. A., RIOS, F. J. B., VASCONCELOS, I. M., FERREIRA, F. V. A., NOJOSA, G. B. A., MEDEIROS, D. A. *Cratylia argentea* seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1737-1747, 2004.

OMS, (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Geneva: WHO, 2000.

PARDO-LÓPEZ, L., GÓMEZ, I., RAUSELL, C., SÁNCHEZ, J., SOBERÓN, 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.

PASTORELLO, E. A., CONTI, A., PRAVETTONI, V., FARIOLI, L., RIVOLTA, F., ANSALONI, R., ISPANO, M., INCORVAIA, C., GIUFFRIDA, M. G., ORTOLANI, C. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 101, p. 531-537, 1998.

PATWARDHAN, A. S., DONIGIAN, JR., CHINNASWAMY, R. V., BARNWELL, T. O. 1997. A retrospective modeling assessment of historic changes in soil carbon and impacts of agricultural development in central USA, 1900 to 1990. p. 485-498. *In* R. Lal, J.M. Kimble, R.F. Follett, and B.A. Stewart. (ed.) Soil processes and the carbon cycle. CRC Press, Boca Raton, FL.

PENNINKS, A. H., KNIPPELS, L. M. Determination of protein allergenicity: studies in rats. **Toxicology Letter**. v. 120, p. 171–180, 2001.

PEDERSEN, J. Application of substantial equivalence data collection and analysis. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Topic 2, 2000. Disponível: www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/ESN/gm/Bio-04.pdf. Acesso em 15 de fevereiro de 2008.

PERLAK, F.J., DEATON, R.W., ARMSTRONG, T.A., FUCHS, R.L., SIMS, S.R., GREENPLATE, J.T., FISCHHOFF, D. A. Insect resistant cotton plants. **Biotechnology**, v. 8, p. 939–943, 1990.

PETERS, H. A., GOCMEN, A., CRIPPS, D. J., BRYAN, G. T., DOGRAMACI, I. Epidemiology of hexachlorobenzene-induced porphyria in Turkey: clinical and laboratory follow-up after 25 years. **Archives of Neurology**, v. 39, p. 744-749, 1982.

PIGOTT C, ELLAR DJ. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 71, p. 255–281, 2007

RAUSELL, C., MUÑOZ-GARAY, C., MIRANDA-CASSOLUENGO, R., GÓMEZ, I., RUDIÑO-PIÑERA, E., SOBERÓN, M., BRAVO, A. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. **Biochemistry**, v. 43, p. 166-174, 2004.

REINHOLD, J. G. Proteínas Totales, albuminas y globulinas. In: RENIER, M. (ed). **Métodos Seleccionados de Análisis Clínicos**. 3ed, Madrid: Aguilar, 1968, v. 1, cap. 15, p. 126-146.

REITMAN, S., FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **American Journal Clinical and Phatological**, v. 28, p. 57-63, 1957.

ROY, A. Reply to comment by d.s. parasnis. **Geophysical Prospecting**, v. 32, p. 142–143, 1984.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory anual, 2 nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SAMPAIO, R. O. **Otimização e utilização da técnica de transformação via tubo polínico em variedade brasileira de algodoeiro**. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Brasília, 2007.

SAMPSON, H.A. Foody allergy. **Jornal Allergy Clinical Immunology**, v.112, p.540-547, 2003.

SANDERS, P. R., LEE, T. C., GROTH, M. E., ASTWOOD, J. D., FUCHS, R. L. Safety assessment of insect-protected corn. In: THOMAS, J. A. **Biotechnology and Safety Assessment**. 2 ed. Taylor and Francis, 1998. p. 241-256.

SANGADALA, S., WALTERS F. S., ENGLISH L. H., ADANG M. J. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and ⁸⁶Rb(+)-K⁺ efflux in vitro. **Journal of Biological Chemistry** v. 269, p. 10088–10092, 1994.

SASAKI, J., ASANO, S., IIZUKA, T., BANDO, H., LAY, B.W., HASTOWO, S., POWELL, G.K., YAMAMOTO, T. Insecticidal activity of the protein encoded by the *cryV* gene of *Bacillus thuringiensis* kurstaki INA-02. **Current Microbiology**, v. 32, p. 195-200, 1996.

SCHRODER, M., POULSEN, M., WILCKES, A., KROGHSBO, S., MILLER, A., FRENZEL, T., DANIER, J., RYCHLIK, M., EMAMI, K., GATEHOUSE, A., SHU, Q., ENGEL, K. H., KNUDSEN, I. A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 339–349, 2007.

SGARBIERI, V.C., WHITAKER, J.R. Physical, chemical and nutritional properties of common beans (*Phaseolus*) proteins. **Advances Food Research**, v. 28, p. 93-166, 1982.

SHIMADA, N., KIM, Y. S., MIYAMOTO, K., YOSHIOKA, M., MURATA, H. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. **Journal of Veterinary Science**, v. 65, p. 187–191, 2003.

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

SJOBLAD, R. D., McCLINTOCK, J. T., ENGLER, R. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 15, p. 3–9, 1992.

SOT – Society of Toxicology Position Paper: The Safety of Foods Produced Through Biotechnology. Annual Conference, San Francisco. C.A. 2002.

TOMLINSON, N. The concept of substantial equivalence, its historical development and current use. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Topic 1, 2000. Disponível em: www.fao.org. Consultado em 19/03/2008

TUTE'IAN, V. A., KRAVCHENKO, L. V., SOROKINA, E. Y., KOROLEV, A. A., AVREN'EVA, L. I., GUSEVA, G. V., CHERNYSHEVA, O. N., TYSHKO, N. V. Medical and biological assessment of genetically modified maize of line MON 810, resistant to European corn borer, and line GA21, resistant to glyphosphate: toxicological and biochemical investigation. **Voprosy Pitaniya**, v. 70, p. 28-31, 2001.

VADLAMUDI, R. K., JI, T. H., BULLA, L. A. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Berliner*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 12334-12340, 1993.

VADLAMUDI, R. K., WEBER, E., JI, I., JI, T. H., BULLA, L. A. JR. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Biology Chemistry**. v. 270, p. 5490–5494, 1995.

VIÉ, V., VAN MAU, N., POMARÈDE, P., DANCE, C., SCHWARTZ, J. L., LAPRADE, R., FRUTOS, R., RANG, C., MASSON, L., HEITZ, F., LE GRIMELLE, C. Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. **Journal of Membrane Biology**. v. 180, p. 195-203, 2001.

VAECK, M., REYNAERTS, A., HOFTE, H., JANSSENS, S., DE BEUCKELEER, M., DEAN, C., ZABEAU, M., VAN MONTAGU, M., LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, p. 33–37, 1987.

VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A., SIEBRA, E. A., OLIVEIRA, J. T., MELO, V. M. M., CARLINI, C. R., CASTELAR, L. I. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 55-62, 2001.

VASCONCELOS, I. M., OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 385-403, 2004.

VOSTERS, A. F., EVANS, D. B., TARPLEY, W. G., SHARMA, S. K. On the engineering of rDNA proteins for purification by immobilized metal affinity chromatography: applications to alternating histidine-containing chimeric proteins from recombinant *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.3, p. 18-26, 1992.

WALKER, R. Safety testing of food additives and contaminants as the long term evaluation of foods produced by biotechnology. Report of a joint. FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Topic 6, 2000. Disponível em: www.fao.org. Consultado em 02/02/2008.

WHO, 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of joint FAO/WHO. Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Disponível em: www.fao.org. Acessado em: 12 de março 2008.

WHO, 2000. Safety aspects of genetically modified of plant origin. Report of joint FAO/WHO Expert Consultation on foods Derived Biotechnology. Geneva: WHO, 29p. Disponível: www.fao.org. Acessado em 11/02/2008.

WHO, 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology. Report of Joint FAO/WHO Consultation. Geneva: WHO, p. 59.

WHO, 1987. Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Food. World Health Organization (WHO), International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva, Switz. Environmental Health Criteria, No. 70. Disponível em: www.inchem.org. Acessado em 15/03/2008.

WOLFERSBERGER, M. G. V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. **Journal of Experimental Biology**, v. 172, p. 377–386, 1992.