



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

DAVI FELIPE FARIAS

BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DE PROTEÍNAS Cry:
DOS MÉTODOS CLÁSSICOS À ERA ÔMICA

FORTALEZA

2013

DAVI FELIPE FARIAS

BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DE PROTEÍNAS Cry:
DOS MÉTODOS CLÁSSICOS À ERA ÔMICA

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

Co-orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Co-orientador: Dr. Ad. A. C. M. Peijnenburg

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- F238b Farias, Davi Felipe.
Biossegurança alimentar de proteínas cry: dos métodos clássicos à era ômica. / Davi Felipe Farias. – 2013.
242f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Bioquímica.
Orientação: Profa. PhD. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.
Coorientação: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá.
Coorientação: PhD. Ad A. C. M. Peijnenburg.
1. Biossegurança alimentar. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. Proteínas. I. Título.

DAVI FELIPE FARIAS

BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DE PROTEÍNAS Cry:
DOS MÉTODOS CLÁSSICOS À ERA ÔMICA

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica

Aprovada em: 13/03/2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^ª. Maria Fátima Grossi de Sá
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa-Cenargen)

Dr. Ad. A. C. M. Peijnenburg
RIKILT – Institute of Food Safety, Wageningen University and Research Centre

Prof^ª. Dr^ª. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Flávio Finardi Filho
Universidade de São Paulo (USP)

À minha orientadora, Prof^ª. Ana, aos meus co-orientadores, Dra. Fátima Grossi e Dr. Ad Peijnenburg, aos meus pais e irmãos, aos meus parentes e amigos mais próximos e ao meu amado Carlosnaik.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, primeiro pela agradável convivência ao longo de onze anos, pelo profissionalismo e pelas lições de ética cedidas em tantos momentos importantes da minha formação como cidadão, educador e pesquisador. Também não poderia esquecer-me de agradecer pelo companheirismo e amizade em tantos momentos difíceis, e pelos incontáveis momentos divertidos. Por fim, por ter me propiciado uma formação ímpar, ao modelo daquela que os grandes mestres davam aos seus pupilos, permeando as mais diversas áreas do conhecimento humano, com ênfase em História e Arte. Certamente, a música, os livros, as fotografias, gravuras, pinturas e conversas afins, que sempre fizeram parte do nosso ambiente de trabalho, proporcionaram um diferencial a minha formação. Meu sincero, muito obrigado.

À Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, inicialmente por aceitar participar da minha banca examinadora e por reservar algumas horas de sua concorrida agenda para contribuir com sugestões para a minha tese. Além disso, pela grande receptividade e por ter acreditado e aceitado prontamente nas propostas iniciais para execução deste trabalho. Também pela presteza e por ter me acolhido muito bem e por várias vezes em seu laboratório.

Ao Dr. Ad Peijnenburg, por aceitar vir de tão longe para participar da minha banca examinadora e estar sempre disposto a contribuir para melhoria deste trabalho. Também pela grande contribuição científica a este trabalho e pelos muitos ensinamentos que certamente agregaram valor a minha formação. Como não poderia esquecer, pela incomparável recepção na Holanda, por todo o suporte oferecido nos momentos mais difíceis de adaptação a nova cultura e ao longo de todo o estágio, pela amizade, presteza e pelas inúmeras lições de humildade e profissionalismo.

À Profa. Vânia Maria Maciel Melo, inicialmente por aceitar participar da minha banca examinadora e reservar algumas horas de sua rotina para dar contribuições ao meu trabalho. Especialmente, por ter sido sempre uma grande parceira científica e uma incentivadora permanente do meu trabalho e da minha trajetória como estudante e cientista. Também, por disponibilizar-me toda a infraestrutura de seu laboratório e pessoal, não só para execução deste trabalho, mas em todos os momentos que precisei.

Ao Prof. Dr. Flávio Finardi Filho, inicialmente por aceitar de imediato participar da minha banca examinadora e por disponibilizar parte de seu tempo para contribuir com sugestões para a minha tese.

À Profa. Ilka Maria Vasconcelos, por me receber sempre em seu laboratório com alegria, carinho e paciência, disponibilizando toda a infraestrutura de seu laboratório e pessoal para a execução deste trabalho. Além disso, por disponibilizar-se a esclarecer minhas dúvidas, pelas valiosas sugestões e por acreditar sempre em minhas contribuições para os seus projetos.

A todos os professores que ministraram disciplinas para o Curso de Doutorado em Bioquímica da UFC, pelos conhecimentos cedidos e, em especial, à Profa. Ilka Maria Vasconcelos, ao Prof. José Tadeu Abreu de Oliveira, à Profa. Dirce Fernandes de Melo, à Profa. Norma Barros Benevides, à Profa. Cristina Paiva da Silveira e a Profa. Erika Freitas Mota pelas aulas motivadoras e instigantes, que certamente fizeram a diferença na minha formação.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos, Coordenador, do Prof. Dr. José Hélio Costa, Vice-Coordenador, e de Maria de Fatima Andrade, Assistente Administrativa, pelo apoio institucional no decorrer de meu curso de Doutorado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), onde a maior parte deste trabalho foi realizada, inicialmente, à velha guarda, Lady Clarissa, Glauber Pacelli, Terezinha Souza e Geórgia Sampaio, pelo grande e impagável apoio em todas as etapas deste trabalho, pela amizade e companheirismo. À nova geração, mas já muito querida, Thiago Almeida, Luiz Carlos, Jackeline Medeiros, Renalison Farias, Renata Silva, Gabrielle de Paula, Nayana Soares, Pedro Matheus Sousa, Leonardo Rogério e Vanessa Lucas. Em especial, a Martônio Viana e Nathanna Mateus, também da velha guarda, mas me auxiliaram na execução de grande parte desta tese, e sem o apoio dos dois tudo teria mais difícil ou inviável. Serei eternamente grato.

À Francisca Berenice Alves (Berê), por sua amizade, alegria, presteza e carinho em tantos momentos.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Interação Molecular Planta Praga I, em especial, a Luciane Guimarães, Gustavo Oliveira, Magda Beneventi, Leonardo Macedo, Caroline Bezerra, Raquel Sampaio, Renata Bomfim, Roberta Coelho, Dijair Júnior e Patrícia Pelegrini pelo apoio na execução deste trabalho e excelente recepção e apoio nas minhas estadias em Brasília.

A todos os amigos e colegas do RIKILT – Institute of Food Safety, em especial, ao Dr. Peter Hendriksen, Liza Portier, Stoopen Geert, Eveline Kramer, Marieke Pen, Marit Reitsma e, aos amigos brasileiros, Carla Mello, Fábio Brod, Andrea Silva, Joseph Alberto e Gislene Bremer, por todo o apoio, amizade e companheirismo, sem o qual esse trabalho não teria sido realizado.

Ao Laboratório de Oncologia Experimental, em especial, a Profa. Cláudia Pessoa, Bruno Coelho e Bruno Soares, pelo apoio em vários procedimentos experimentais.

Ao Laboratório de Microcopia de Força Atômica, na pessoa do Dr. Luciano Paulino Siva, pelo apoio na realização das análises de integridade celular.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia e do Laboratório de Microbiologia Ambiental, pelo grande apoio prestado em todos os ensaios com microrganismos apresentados neste trabalho. Em especial, agradeço a Profa. Vânia Melo, Denise Hissa, Tallita Tavares, Júlio Ximenes, Alysson Angelim, Samantha Pinheiro e Vanessa Nogueira, pelo apoio mais próximo e convivência agradável durante todos esses anos.

A todos os colegas do Laboratório de Toxinas Vegetais, pelo grande apoio prestado em vários momentos da execução deste trabalho. Em especial, a Profa. Daniele Sousa, Juliana Gifoni, Janne Keila Morais, Adelina Batista, Henrique Oliveira, Daniel Câmara, Mirella Pereira, Ellen Paula e Raquel Rocha por sempre estarem dispostos a ajudar em todos os momentos que precisei.

Ao amigo Francisco Valdenor de Oliveira, pelo companheirismo e amizade cedidos diariamente.

A todos os colegas e amigos da turma de Doutorado 2009.1, pelo companheirismo durante todo o curso e, em especial, a Eliane Silva pela amizade em todos os momentos, seja na alegria ou na tristeza.

A todos os meus amigos, por me oferecerem todo um suporte emocional durante os quatro anos do Doutorado. Em especial, a Carol Mosca, Ângela Azevedo, Vanja Viana, Cristiane Pacheco, Arjaan Pellis, Saskia Lenders, Johannes Rieche, Amandine Pastor, Mario Kicker, Laura de Haan, Tâmara Bezerra, Autran Coelho, Euvlaudia Veras e Pedro André, pelo amor e carinho cedidos em tantos momentos difíceis, mas também por compartilhar momentos únicos da minha vida.

À minha avó, Margarida, uma das maiores incentivadoras da minha trajetória acadêmica, bem como meus tios e tias maternos, em especial, Ana Marta Farias, Prazeres Farias e Ana Kátia Farias, também a todos os meus primos(as) pelo apoio incondicional em tantos momentos difíceis pelos quais passei.

Aos meus pais, Antonio Felipe Filho e Ana Maria Farias, que sempre me proporcionaram as condições adequadas para meu crescimento e desenvolvimento pessoal e profissional. São meu porto seguro e a razão que me impulsiona a lutar e crescer todos os dias. Seus ensinamentos me guiaram por um caminho de luta e honestidade.

Aos meus amados irmãos e amigos, Juliana Farias e Felipe Júnior, pela amizade e companheirismo durante toda a vida.

Em especial, ao meu amor Carlosnaik Veras, pelos imensuráveis: amor, companheirismo, amizade e carinho, cedidos durante toda a execução deste trabalho. Sem ele, tudo teria sido muito mais difícil.

Ao meu Deus (“energias do bem”), que me guia e me acompanha, ajudando-me a alcançar todos os meus objetivos, sempre me fazendo refletir que o maior engrandecimento pessoal proporcionar o crescimento dos que nos cercam.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições/órgãos:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Departamento de Biologia da UFC.

Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Departamento de Biologia, UFC.

Laboratório de Oncologia Experimental, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC.

Laboratório de Microscopia de Força Atômica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa-Cenargen), Distrito Federal, Brasília.

Laboratório de Toxinas Vegetais, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC.

Plant Research International (PRI), Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Holanda.

Laboratório de Interação Molecular Planta Praga I, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa-Cenargen), Distrito Federal, Brasília.

RIKILT, Institute of Food Safety, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Holanda.

Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, onde a maior parte deste trabalho foi desenvolvida.

“Eu vi um anjo em um bloco de mármore e o
esculpi para libertá-lo.” (Michelangelo)

RESUMO

Atualmente são liberadas para comercialização no mercado agrobiotecnológico brasileiro, pelo menos, 12 variedades de algodão expressando proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) para conferir resistência ao ataque de insetos. Contudo, essas proteínas são ativas contra lepidópteros, enquanto que a principal praga da cotonicultura brasileira é um coleóptero, o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Neste contexto, têm-se feito um grande esforço na busca por novas moléculas Cry ativas contra coleópteros. Utilizando técnicas de evolução molecular dirigida *in vitro*, foi desenvolvida a proteína mutante Cry8Ka5, que é várias vezes mais tóxica contra o bicudo do que a proteína original, Cry8Ka1, inicialmente descoberta. Dada a sua atividade promissora contra coleópteros, Cry8Ka5 está sendo utilizada para o desenvolvimento de um novo algodão *Bt*, bem como de outras culturas *Bt* de importância econômica. No entanto, como parte das exigências legais para a liberação comercial de uma planta transgênica, essa proteína recombinante deve ser testada quanto a sua biossegurança alimentar (BA) a fim de detectar potenciais efeitos alergênicos, tóxicos e/ou antimetabólicos. Assim, este trabalho objetivou realizar uma ampla avaliação de BA da proteína mutante Cry8Ka5 e da proteína Cry1Ac, já incorporada em várias culturas *Bt* comercializadas. A última foi utilizada como proteína controle ou teste dependendo do ineditismo da abordagem empregada em cada seção do trabalho. Nesse âmbito, a avaliação de BA proposta cobriu desde as exigências legais até a execução de metodologias, até então, nunca propostas para avaliação de segurança de consumo de produtos de *Bt*. Para tanto, este trabalho estruturou-se em quatro capítulos. O Capítulo 1 objetivou realizar uma revisão da literatura acerca do estado da arte das plantas *Bt* e proteínas Cry, bem como fornecer um entendimento geral sobre os conceitos e a legislação vigente em BA de plantas GM. Já o Capítulo 2 objetivou avaliar a BA da entomotoxina mutante Cry8Ka5 através do método de duas etapas baseado em pesos de evidência que, por sua vez, atende a todas as recomendações da CTNBio. Neste caso, a proteína Cry1Ac foi utilizada como controle experimental, pois abordagens similares já foram realizadas com essa molécula. Baseando-se nos métodos oficiais, é possível concluir que não é esperado qualquer risco associado ao consumo da proteína Cry8Ka5 devido aos seguintes resultados encontrados: 1. Produtos *Bt* mostraram ter longo histórico de uso seguro; 2. A proteína Cry8Ka5 não mostrou similaridade significativa de sua sequência de aminoácidos primária com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais; 3. As proteínas Cry mostraram possuir modo de ação bastante compreendido e elevada especificidade contra insetos; 4. Cry8Ka5 foi altamente susceptível à digestão em fluido gástrico simulado; 5. A

proteína Cry8Ka5 não causou efeitos adversos relevantes em camundongos (5.000 mg de proteína/Kg de peso corpóreo, via oral, dose única). Por sua vez, o Capítulo 3 objetivou avaliar a proteína Cry8Ka5 e a Cry1Ac quanto aos seus efeitos cito- e genotóxicos em uma série de testes clássicos e alternativos, além de pesquisar seus efeitos antimicrobianos. As proteínas não causaram efeitos cito- ou genotóxicos em linfócitos humanos (ambas com $CI_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$ em todos os testes), não promoveram hemólise em suspensões de eritrócitos de humanos (tipos A, B, AB e O), de coelho e rato (ambas com $CI_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$ para todas as espécies), enquanto somente a Cry8Ka5 causou alterações na topografia de membrana celular de eritrócitos humanos do tipo O, na concentração de $1.000 \mu\text{g/mL}$, detectadas via microscopia de força atômica. Além disso, as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac não apresentaram citotoxicidade elevada contra náuplios de *Artemia* sp. ($CL_{50} > 700$ e $> 1000 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) e não inibiram o crescimento de quatro cepas de bactérias e quatro de leveduras (ambas com $CIM > 1.000 \mu\text{g/mL}$ para todos os microrganismos testados). Por fim, o Capítulo 4 objetivou avaliar os efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac e de um “pool” de peptídeos de cada uma (Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep, respectivamente), obtidos por digestão sequencial *in vitro*, sobre o perfil de expressão gênica de células de carcinoma de mama MCF-7 e de carcinoma de cólon Caco-2, ambas de origem humana. Nenhuma das amostras testadas causou alterações no perfil de expressão gênica das células Caco-2 diferenciadas (utilizadas como um modelo de epitélio intestinal humano), mesmo quando testadas em alta concentração ($100 \mu\text{g/mL}$). Nos testes de exposição com células MCF-7 indiferenciadas, apenas a proteína Cry1Ac causou alterações significativas no padrão de expressão gênica. Contudo, esse efeito não foi detectado após tratamento dessas células com a amostra digerida de Cry1Ac (Cry1Ac-pep), que, por sua vez, mimetiza melhor as condições reais de exposição às moléculas Cry. As abordagens experimentais utilizadas nos três últimos capítulos mostraram-se bastante úteis e, após tudo que foi exposto, foi possível confirmar o caráter inócuo da proteína Cry1Ac, bem como concluir que a proteína Cry8Ka5 é uma ferramenta biotecnológica segura para o desenvolvimento de plantas de algodão *Bt* para conferir resistência ao ataque do bicudo-do-algodoeiro.

Palavras-chaves: Biossegurança alimentar, Cry8Ka5, Cry1Ac, *Bacillus thuringiensis*, *Anthonomus grandis*, algodão *Bt*, toxicogenômica.

ABSTRACT

Currently at least 12 varieties of cotton expressing Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) are released for sale in Brazil to confer resistance to insect attack. However, these proteins are active against lepidopteran, whereas the major pest of Brazilian cotton is a beetle, the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). In this context, great efforts have been dedicated in the search for new Cry molecules active against coleopteran. Using techniques of *in vitro* directed molecular evolution, the Cry8Ka5 mutant protein was developed, which is several times more toxic against the boll weevil than the original protein, Cry8Ka1, initially discovered. Given its promising activity against coleopteran, Cry8Ka5 is being used for the development of a new *Bt* cotton, as well as of other *Bt* crops of economic importance. However, as part of legal requirements for the commercial release of a transgenic plant, the recombinant products should be tested for their food safety (FS) in order to detect potential allergenic, toxic and antimetabolic effects. This study aimed to perform a comprehensive FS assessment of the Cry8Ka5 mutant protein and of the Cry1Ac protein, already incorporated in several commercialized *Bt* crops. The latter was used as a protein control or test depending on the originality of the approach used in each section of this work. The FS evaluation performed covered not only the legal requirements but also the implementation of methodologies hitherto never proposed to assess the safety of consumption of *Bt*. For that, this study was structured in four chapters. Chapter 1 aimed to conduct a literature review on the state of the art of *Bt* plants and Cry proteins, as well as provide a general understanding of the concepts and current legislation in GM plants FS. Chapter 2 aimed to evaluate the FS of Cry8Ka5 mutant entomotoxin through the two-step method based on weights of evidence that, in turn, meets the recommendations of CTNBio. In this section, the Cry1Ac protein was used as experimental control, since similar approaches have already been performed with this molecule. Based on official methods, we conclude that it is not expected any risk associated with consumption of protein Cry8Ka5 due to the following results found: 1. *Bt* products were shown to have a long history of safe use, 2. The protein showed no significant similarity in its primary amino acid sequence with known allergenic, toxic and/or antinutritional proteins; 3. The mode of action and high specificity against insects of Cry proteins are well known; 4. Cry8Ka5 was highly susceptible to digestion in simulated gastric fluid; 5. The protein Cry8Ka5 caused no significant adverse effects in mice (5,000 mg protein/kg body weight, orally, single dose). Chapter 3 aimed to evaluate the Cry8Ka5 and Cry1Ac proteins as to their cyto- and genotoxicity in a serie of conventional and alternative tests as well as antimicrobial

effects. The proteins did not cause cyto- or genotoxic effects in human lymphocytes (both with $IC_{50} > 1,000 \mu\text{g/mL}$ in all tests), did not cause hemolysis in human (types A, B, AB and O), rabbit and rat (both with $IC_{50} > 1,000 \mu\text{g/mL}$ for all species) erythrocytes, but only Cry8Ka5 caused changes in the topography of the cell membrane of human O type erythrocytes at a concentration of $1,000 \mu\text{g/mL}$, detected by atomic force microscopy. Furthermore, the Cry8Ka5 and Cry1Ac proteins showed no cytotoxicity against *Artemia* sp. nauplii ($LC_{50} > 700$ and $>1000 \mu\text{g/mL}$, respectively), and did not inhibit the growth of four strains of bacteria and four of yeasts (both with $MIC > 1,000 \mu\text{g/mL}$ for all microorganisms tested). Finally, Chapter 4 aimed to evaluate the effects of Cry8Ka5 and Cry1Ac proteins and of a "pool" of peptides of each one (Cry8Ka5-pep and Cry1Ac-pep, respectively), obtained by *in vitro* sequential digestion, on the gene expression profile of MCF-7 breast carcinoma cells and Caco-2 colon carcinoma cells, both human. No sample caused changes in the gene expression profile of differentiated Caco-2 cells (used as a model for human intestinal epithelium), even when tested at high concentration ($100 \mu\text{g/mL}$). In the exposure tests with undifferentiated MCF-7 cells, only Cry1Ac (at $100 \mu\text{g/mL}$) caused significant changes in the gene expression pattern. However, this effect was not detected after treatment of these cells with the sample digested of Cry1Ac (Cry1Ac-pep), which, in turn, better mimic actual conditions of exposure to Cry molecules. The experimental approaches used in the last three chapters were quite useful and, after all the above, it was possible to confirm the harmless nature of the Cry1Ac protein and conclude that the Cry8Ka5 protein is a safe biotechnological tool for the development of *Bt* cotton plants to confer resistance against the cotton boll weevil attack.

Keywords: Food safety, Cry8Ka5, Cry1Ac, *Bacillus thuringiensis*, *Anthonomus grandis*, *Bt* cotton, toxicogenomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1 - Modo de ação de proteínas Cry, com ênfase no mecanismo de formação de poro no intestino de insetos-alvo. 1) Solubilização do cristal e clivagem proteolítica da protoxina, liberando a proteína ativa; 2) Proteína ativa se ligando ao receptor primário do tipo caderina; 3) Formação do oligômero (estrutura conhecida como pré-poro), aumento da afinidade da proteína aos receptores secundários; 4) Ligação do oligômero com os receptores secundários; 5) Interação entre a membrana da célula e o oligômero formado de proteínas ativas e a formação do canal iônico, causando efeitos citopatológicos que acarretam na lise celular. Figura adaptada de BRAVO et al. (2007) 43
- Figura 1.2 - Diagramas de fita do modelo estrutural sugerido para Cry8Ka1, indicando as posições de substituição de aminoácidos na toxina Cry8Ka5. A) A molécula inteira mostrando os três domínios (domínio I de cor castanha, II na cor azul e III na cor amarela). Os resíduos substituídos na Cry8Ka5 estão em destaque na cor magenta; B) o Domínio I composto por oito α -hélices. A posição da mutação R82Q é indicada na α -hélice 3; C) As folhas β anti-paralelas do Domínio II, indicando dois resíduos substituídos na toxina Cry8Ka5: Cys e Ala nas posições 260 e 321, respectivamente; D) As folhas β “jelly-roll” do Domínio III, os três outros resíduos mutados: Gly na posição 508, Glu na 538 e Asn em 594. Adaptado de Oliveira et al. (2011) 55
- Figura 1.3 - Esquema mostrando todas as etapas para avaliação da biossegurança alimentar de produtos derivados de plantas DNA-recombinantes de acordo com as recomendações do Codex Alimentarius (2009). Em verde, as etapas para avaliação de risco dos produtos expressos pelos genes exógenos 64
- Figura 1.4 - Abordagem em duas etapas baseada em pesos de evidência para avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes. Adaptado de Delaney *et al.* (2008) 70

- Figura 2.1 - Resultado da pesquisa de sítios potenciais de N-glicosilação na 105
sequência da proteína Cry8Ka5 de acordo com o programa NetNGlyc
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Um sítio potencial na
posição 573 da sequência é mostrado
- Figura 2.2 - Resultado da pesquisa de sítios potenciais de N-glicosilação na 106
sequência da proteína Cry1Ac de acordo com o programa NetNGlyc
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Sítios potenciais nas
posições 170, 410, 452 e 470 são mostrados
- Figura 2.3 - A) Perfis eletroforéticos dos produtos de expressão heteróloga da 111
proteína Cry8Ka5 em gel de poliacrilamida (12,5%) em condições
redutoras e desnaturantes. B) Perfis eletroforéticos dos produtos de
expressão heteróloga da proteína Cry1Ac em gel de poliacrilamida
(12,5%) em condições redutoras e desnaturantes
- Figura 2.4 - Digestão em fluido gástrico simulado (FGS) de Cry8Ka5 (A) e de 113
Cry1Ac (B), ambas na concentração de 0,25 mg/mL, em diferentes
tempos de incubação a 37 °C. M, marcadores de massa molecular: 14,4;
20,1; 31,0; 45,0; 66,2; 97,0; 116,0; 212,0 kDa; P, Cry8Ka5 ~66,0 kDa
sem FGS; P', Cry1Ac ~66,0 kDa sem FGS; FGS, fluido sem incubação;
FGS', fluido com incubação por 0; 30 min
- Figura 2.5 - Digestão em fluido intestinal simulado (FIS) de Cry8Ka5 (A) e de 114
Cry1Ac (B), ambas na concentração de 0,25 mg/mL, em diferentes
tempos de incubação a 37 °C. M, marcadores de massa molecular: 14,4;
20,1; 31,0; 45,0; 66,2; 97,0; 116,0; 212,0 kDa; P, Cry8Ka5 ~66,0 kDa
sem FIS; P', Cry1Ac ~66,0 kDa sem FIS; FIS, fluido sem incubação;
FIS', fluido com incubação por 0; 30 min
- Figura 2.6 - Teste de estabilidade térmica da Cry8Ka5 (A) e de Cry1Ac (B), ambas 115
na concentração de 0,25 mg/mL em tampão de solubilização específico.

M, marcadores de massa molecular: 14,4; 20,1; 31,0; 45,0; 66,2 kDa; 1, Cry8Ka5 ~66,0 kDa (A) e Cry1Ac ~66,0 kDa (B) à 4 °C; 2 – 4, Cry8Ka5 (A) e Cry1Ac (B) submetidas à 100 °C por 10; 30 e 60 min

- Figura 2.7 - Secções histológicas coradas com HE dos órgãos de camundongos fêmeas tratados com dose única via oral de 5.000 mg/kg de peso corpóreo da proteína Cry8Ka5 ou Cry1Ac ou água destilada. A análise histopatológica não constatou danos inerentes à veiculação das Cry aos animais. As imagens dos diferentes tecidos foram capturadas em diferentes aumentos de forma a representar melhor a estrutura do órgão: cérebro, escala da barra = 50µm; timo, 100µm; coração, 50µm; pulmão, 100µm; estômago, 100µm; duodeno, 50µm; ceco, 100µm; baço, 50µm; pâncreas, 50µm; fígado, 50µm; rim, 50µm; bexiga, 100µm; ovário, 50µm; tuba uterina, 100µm; e, útero 100µm 123
- Figura 3.1 - A) Perímetro (*perimeter*) e largura padrão (*pattern width*); B) Área excluindo vazios; C) Área incluindo vazios; e, D) Área de superfície. Adaptado de Particle Analysis Software – Instruction Manual (Shimadzu, Japan) 152
- Figura 3.2 - Índice de dano ao DNA de linfócitos humanos expostos por 24 h à proteína teste Cry8Ka5 e a controle Cry1Ac. Solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, foi utilizado como controle negativo (-) e doxorubicina na concentração de 0,6 µM foi utilizada como controle positivo (+). 1, 2 e 3 correspondem a Cry1Ac nas concentrações de 100, 500 e 1.000 µg/mL, respectivamente. 4, 5 e 6 correspondem a Cry8Ka5 nas concentrações de 100, 500 e 1.000 µg/mL, respectivamente. Os dados correspondem à média ± erro padrão de quatro experimentos independentes. *p < 0,05; comparado com o controle negativo por ANOVA/Newman-Keuls 158
- Figura 3.3 - Imagens em 2D e 3D (100 x 100 µm) de eritrócitos humano (tipo O) captadas por microscopia de força atômica. (A) Filme de sangue tratado 161

com 1.000 µg/mL da proteína Cry8Ka5; (B) Filme de sangue tratado com 1.000 µg/mL da proteína Cry1Ac; (C) Filme de sangue tratado com 1.000 µg/mL de albumina sérica bovina; e, (D) Filme de sangue não-tratado. As setas indicam a presença visível das proteínas Cry nas imagens

- Figura 4.1 - Fluxograma de atividades proposto para avaliação toxicogenômica comparativa dos efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac e de suas amostras de peptídeos, Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep, sobre o perfil de expressão gênica das linhagens de células humanas MCF-7 (carcinoma de mama) e de Caco-2 (carcinoma de cólon) diferenciada, um modelo de epitélio de intestino humano, no contexto da avaliação de biossegurança alimentar de uma nova proteína recombinante 177
- Figura 4.2 - Alinhamento múltiplo de seqüências entre as proteínas Cry8Ka5 (A) e Cry1Ac (B) e suas respectivas amostras de peptídeos obtidos por digestão com pepsina e digestão sequencial com pepsina e tripsina, ambas *in vitro*. O alinhamento foi feito utilizando a ferramenta gratuita na Internet, Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 197
- Figura 4.3 - Células de carcinoma de mama MCF-7 expostas às proteínas teste Cry8Ka5 e Cry1Ac, as amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e a várias proteínas controle, por 24 h. (A) Cry8Ka1; (B) Cry8Ka5; (C) Cry8Ka5-pep; (D) Cry1Ac; (E) Cry1Ac-pep; (F) Digestão controle; (G) PHA-E; (H) SBTX, todas na concentração de 122,5 µg/mL; (I) Colistina 76,8 µg/mL; (J) PBS 7%; (K) Microcistina-LR 25 µg/mL; e, (L) DMSO 0,25 %. A barra de escala de todas as imagens é 200 µm 200
- Figura 4.4 – Mapas de expressão (“heat-maps”) mostrando os genes expressos diferencialmente em células MCF-7 (A) e células diferenciadas Caco-2 (B) após tratamento por 24 h com Cry8Ka5, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, Cry8Ka5-pep e demais proteínas/peptídeos controle. Genes regulados > 1,62 vezes para cima ou para baixo regulados em, pelos menos, duas das três repetições foram selecionados e não afetados > 1,41 nos arranjos dos 207

veículos (DMSO e PBS). Verde - representa regulação para baixo; preto - nenhuma mudança; e, vermelho - regulação para cima. A intensidade da cor relacionada com a proporção de $2\log$ de regulação para cima ou para baixo é indicada pela barra. No mapa de MCF-7, 5 grupos de padrões de expressão de gene (A - E) podem ser distinguidos, enquanto para Caco-2, são 4 agrupamentos de genes (A - D). Caminhos ou processos biológicos para os quais genes estão super-representados em agrupamentos foram definidos de acordo com análise no MetaCore

Figura 4.5 – Análises de enriquecimento de genes (GSEA) dos dados de 213
microarranjos de células MCF-7 tratadas por 24 h com a proteína Cry8Ka5, com a amostra de peptídeos Cry8Ka5-pep e demais proteínas/peptídeos controle. Mapa de expressão (“heat-map”) mostrando os agrupamentos de genes do banco de dados BioCarta que foram significativamente regulados pelos vários tratamentos (como encontrado pelo GSEA). Verde - representa regulação para baixo; preto - nenhuma mudança; e, vermelho - regulação para cima. Microcystin = microcistina; colistin = colistina; digestion control = digestão controle; Cry1Ac peptides = Cry1Ac-pep; Cry8Ka5 peptides = Cry8Ka5-pep

Figura 4.6 – Análises de enriquecimento de genes (GSEA) dos dados de 214
microarranjos de células MCF-7 tratadas por 24 h com Cry8Ka5, Cry1Ac, Cry8Ka5-pep, Cry1Ac-pep e demais proteínas/peptídeos controle. Mapa de expressão (“heat-map”) mostrando os agrupamentos de genes do banco de dados BioCarta que foram significativamente regulados pelos vários tratamentos (como encontrado pelo GSEA). Verde - representa regulação para baixo; preto - nenhuma mudança; e, vermelho - regulação para cima. Microcystin = microcistina; colistin = colistina; digestion control = digestão controle; Cry1Ac peptides = Cry1Ac-pep; Cry8Ka5 peptides = Cry8Ka5-pep

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 2.1 - Evolução do peso corpóreo (g) de camundongos fêmeas (n=5/grupo) 118 administradas oralmente com dose única (5.000 mg/ kg peso corpóreo⁻¹) das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac (proteína Cry de referência) e apenas com o veículo, água destilada, durante 14 dias. Os valores são médias \pm desvios-padrão para cada dia de pesagem, sendo todos os desvios-padrão \leq 5%. As medições do peso corpóreo nos dias mencionados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$; One-way ANOVA) entre os grupos
- Gráfico 3.1 - Curvas de crescimento de cepas Gram-positivas, *Bacillus subtilis* (A) e 165 *Staphylococcus aureus* (B), e Gram-negativas, *Enterobacter aerogenes* (C) e *Salmonella choleraesuis* (D), crescidas em caldo nutritivo, contendo as proteínas Cry8Ka5, Cry1Ac e ovalbumina, todas na concentração de 1.000 $\mu\text{g/mL}$, e os controles não-proteicos tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 e formol 0,4 %. Para todas as leituras de Abs 600, Cry8Ka5 não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$; One-way ANOVA) quando comparada ao controle Cry1Ac, a ovalbumina ou ao tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. Da mesma forma, Cry1Ac não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$; One-way ANOVA) quando comparada ao controle ovalbumina ou ao tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0
- Gráfico 4.1 - Viabilidade celular da linhagem humana de carcinoma de mama MCF- 198 7 e de carcinoma de cólon Caco-2, ambas indiferenciadas, após 24 h de exposição às proteínas teste Cry8Ka5 e Cry1Ac, as amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e a várias proteínas controle, medida através do teste ATPlite™. A viabilidade relativa foi obtida com base no percentual de viabilidade das células tratadas apenas com os veículos, DMSO ou PBS. Resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão de uma triplicata. A) Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry8Ka1, Cry1Ac, Cry1Ac-pep e a digestão controle, em concentrações variando de 30,6 a 244,5 $\mu\text{g/mL}$; B) PHA-E (eritrohemaglutinina de *P. vulgaris*) e SBTX (toxina da soja) em

concentrações variando de 30,6 a 244,5 $\mu\text{g/mL}$; C) Microcistina-LR em concentrações variando de 50 a 100 $\mu\text{g/mL}$; D) Colistina em concentrações variando de 9,6 a 76,8 $\mu\text{g/mL}$

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso de produtos à base de <i>Bt</i> e das proteínas Cry*	94
Tabela 2.2 - Pesquisa de similaridade da sequência primária completa das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac com proteínas tóxicas, antinutricionais e alergênicas em banco de dados gerais (não-especializados) de proteínas*	97
Tabela 2.3 - Pesquisa de similaridade na sequência de aminoácidos primária das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac em banco de dados de proteínas alergênicas	100
Tabela 2.4 - Avaliação da presença de peptídeos de Cry8Ka5 e Cry1Ac detectados em proteínas alergênicas em epítomos de alérgenos depositados no banco de dados ADFS (“Allergen Database for Food Safety”)*	101
Tabela 2.5 - Resultados da pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed* do NCBI acerca do modo de ação e especificidade das proteínas Cry de <i>Bt</i> , bem como da proteína em estudo Cry8Ka5	109
Tabela 2.6 - Peso úmido relativo (%) dos órgãos de camundongos fêmeas (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5000 mg/ kg peso corpóreo ⁻¹) das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac (proteína Cry de referência) e apenas com o veículo, água destilada*	119
Tabela 2.7 - Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5000 mg/ kg peso corpóreo ⁻¹) das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac (proteína Cry de referência) e apenas com o veículo, água destilada*	120
Tabela 2.8 - Parâmetros séricos de camundongos fêmeas (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5000 mg/ kg peso corpóreo ⁻¹) das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac (proteína Cry de referência) e apenas	122

com o veículo, água destilada *

Tabela 3.1 -	Atividade citotóxica em linfócitos humanos periféricos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac avaliada pelo ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol], após 72 h de exposição	157
Tabela 3.2 -	Presença de atividade hemolítica em suspensões de eritrócitos a 1% de diferentes espécies de mamíferos tratadas com Cry8Ka5, Cry1Ac e demais controle proteicos e não-proteicos*	159
Tabela 3.3 -	Parâmetros unidimensionais, bidimensionais e tridimensionais da morfologia de eritrócitos tratados com Cry8Ka5, Cry1Ac ou albumina sérica bovina, todas na concentração de 1.000 µg/mL, avaliados por microscopia de força atômica *	160
Tabela 3.4 -	Avaliação de citotoxicidade em náuplios de <i>Artemia</i> sp. da Cry8Ka5, Cry1Ac e de controles proteicos e não-proteicos após 24 h de exposição	164
Tabela 4.1 -	Peptídeos identificados através do MASCOT numa pesquisa contra o banco de dados NCBIInr das amostras de Cry8Ka5 e Cry1Ac digeridas somente com pepsina e digeridas sequencialmente com pepsina e tripsina (digestão sequencial <i>in vitro</i>)	194
Table 4.2 –	Número de genes/”spots” diferencialmente afetados em células MCF-7 indiferenciadas e Caco-2 diferenciadas após tratamento com as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, com as amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e demais amostras controle proteicas, por 24 h*	204
Table 4.3 –	Dados do Mapa Conectivo obtido a partir das assinaturas de expressão das proteínas/peptídeos Cry1Ac, microcistina-LR e SBTX em células MCF-7	210

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADFS	“Allergen Database for Food Safety” (Base de Dados para Biossegurança Alimentar)
AGM	Alimento(s) Geneticamente Modificado(s)
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATCC	“American Type Culture Collection” (Coleção Americana de Cultura Tipo)
Biocen-UFC	Biotério Central da Universidade Federal do Ceará
BHI	“Brain-Heart Infusion” (Infusão de Cérebro e Coração)
Bioprospec	Laboratório de Bioprospeção de Recursos Regionais
BPL	Boas Práticas de Laboratório
BSA	“Bovin Serum Albumin” (Albumina Sérica Bovina)
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
CAC	“Codex Alimentarius Commission” (Comissão do Codex Alimentarius)
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará
CI₅₀	Concentração Inibitória de 50% das células
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CQB	Controle de Qualidade em Biossegurança
CL₅₀	Concentração Letal capaz de matar 50 % organismos
CL-EM	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
CNP	Candidata à Nova Proteína
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimental Animal
CpTI	“Cowpea Trypsin Inhibitor” [Inibidor de tripsina de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i>)
Cry	“Crystal protein” (Proteína cristal)
Cry1Ac-pep	Amostra de peptídeos de Cry1Ac
Cry8Ka5-pep	Amostra de peptídeos de Cry8Ka5
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Cyt	“Cytolytic protein” (Proteínaa citolíticas)

DDA	“Data Dependent Acquisition” (Aquisição dependente de dados)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	“Deoxyribonucleic acid” (Ácido desoxirribonucleico)
DTT	Ditiotreitol
ECM	“Extracellular Matrix” (Matriz Extracelular)
EDTA	“Ethylenediamine tetraacetic acid” (Ácido Etilenodiaminotetracético)
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPI	Equipamento de Proteção Individual
ER	“Endoplasmic Reticulum” (Retículo Endoplasmático)
FAO	“Food and Agricultural Organization” (Organização de Alimentação e Agricultura)
FBT	Força Tarefa Intergovernamental sobre Alimentos Derivados de Biotecnologia
FDA	“Food and Drug Administration” (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América)
FGS	Fluído Gástrico Simulado
FIS	Fluído Intestinal Simulado
GM	Geneticamente Modificado(s)
GPI	“Glycosylphosphatidylinositol” (Glicosilfosfatidil-inositol)
GSEA	“Gene Set Enrichment Analysis” (Análise de Enriquecimento de Genes)
HE	Hematoxilina-Eosina
HOSU	Histórico de Uso Seguro
IC	Intervalo de Confiança
IgE	Imunoglobulina E
IPTG	Isopropil-1-tiol- β -D-galactopiranosídeo
ISAAA	Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações Agrobiotecnológicas
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MFA	Microscopia de Força Atômica
MS	“Mass Spectrometry” (Espectrometria de Massas)
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol
Ni-NTA	Níquel-Ácido Nitrilotriacético
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OGM	Organismo(s) Geneticamente Modificado(s)
OMC	Organização Mundial do Comércio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	“Polyacrylamide gel electrophoresis” (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
PAT	“Phosphinothricin Acetyl Transferase” (Fosfotricina acetiltransferase)
PBMC	“Peripheral Blood Mononuclear Cells” (Células Sanguíneas Mononucleares Periféricas)
PBS	“Phosphate Buffered Saline” (Tampão Fosfato-Salino)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)
PHA-E	Eritrohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNB	Política Nacional de Biossegurança
PST	Proteínas Solúveis Totais
PVDF	“Polyvinylidene difluoride” (Polifluoreto de vinilideno)
RDW-CV	“Red Cell Distribution Width - Coefficient of Variation” (Amplitude de Distribuição das Hemácias medido como Coeficiente de Variação)
RDW-SD	“Red Cell Distribution Width – Standard Deviation” (Amplitude de Distribuição das Hemácias medido como Desvio Padrão)
RNA	“Ribonucleic acid” (Ácido Ribonucleico)
SBTX	“Soybean Toxin” (Toxina da Soja)
SCGE	“Single-Cell Gel Electrophoresis”, Eletroforese em Gel de Células Isoladas
SDAP	“Structural Database of Allergenic Proteins” (Base de Dados Estrutural para Proteínas Alergênicas)
SDS	“Sodium Dodecil Sulfate” (Dodecil Sulfato de Sódio)
TEMED	<i>N', N', N', N'</i> , tetrametiletilenodiamina
TFP	Toxinas Formadoras de Poro
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
US EPA	“US Environmental Protection Agency” (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América)
UV	Ultra-Violeta
VIP	“Vegetative Insecticide Protein” (Proteína Inseticida Vegetativa)

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	34
1	Breve história da Biotecnologia: da domesticação e melhoramento genético de plantas e animais ao advento dos OGM.....	35
2	Desenvolvimento, produção e comercialização de plantas GM: ênfase ao papel do Brasil no mercado mundial.....	37
3	<i>Bacillus thuringiensis</i> e suas δ-endotoxinas.....	40
4	Plantas <i>Bt</i>: trajetória comercial, benefícios, resistência de insetos e algodão <i>Bt</i>.....	45
5	O algodão, <i>Gossypium hirsutum</i> Linnaeus (Malvaceae), e o bicudo-do-algodoeiro, <i>Anthonomus grandis</i> (Boheman, 1843) (Coleoptera:Curculionidae).....	49
6	A entomotoxina mutante Cry8Ka5 e a produção do algodão <i>Bt</i> resistente ao bicudo.....	51
7	Biossegurança: conceito, definições e a legislação brasileira e suas competências.....	56
8	Biossegurança alimentar de plantas GM e seus derivados.....	58
9	Biossegurança alimentar de proteínas recombinantes.....	66
10	Aspectos legais da avaliação de biossegurança alimentar de OGM e seus derivados no Brasil.....	71
	CAPÍTULO 2.....	75
1	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA/JUSTIFICATIVA.....	76
2	OBJETIVOS.....	78
2.1	Objetivos gerais.....	78
2.2.	Objetivos específicos.....	78
3	MATERIAIS.....	79
3.1	Reagentes Biológicos.....	79
3.1.1	<i>Microrganismos</i>.....	79
3.1.2	<i>Animais de Laboratório e alojamento</i>.....	80
3.2	Reagentes químicos e outros materiais.....	80
3.2.1	<i>Reagentes para expressão, purificação e quantificação das proteínas Cry</i>.....	80
3.2.2	<i>Reagentes para eletroforese</i>.....	80

3.2.3	<i>Reagentes para sequenciamento e digestibilidade in vitro</i>	81
3.3	Considerações sobre biossegurança	81
4	MÉTODOS	82
4.1	Levantamento do histórico de uso seguro das proteínas Cry de <i>Bt</i>	82
4.2	Análise de similaridade na sequência de aminoácidos da proteína Cry8Ka5 com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais	82
4.2.1	<i>Avaliação da presença de sítios de N-glicosilação na proteína Cry8Ka5</i>	83
4.3	Determinação do modo de ação e especificidade da proteína Cry8Ka5	84
4.4	Produção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac em sistema heterólogo (<i>E. coli</i>)	84
4.4.1	<i>Expressão e purificação da Cry8Ka5</i>	84
4.4.2	<i>Expressão e purificação da Cry1Ac</i>	85
4.4.3	<i>Quantificação de proteínas solúveis totais</i>	86
4.4.4	<i>Análise das proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)</i>	86
4.4.5	<i>Determinação da pureza das amostras de proteínas de Cry8Ka5 e Cry1Ac</i>	87
4.4.6	<i>Determinação da sequência de aminoácidos N-terminal das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac</i>	87
4.5	Determinação da digestibilidade <i>in vitro</i> e estabilidade à temperatura da proteína Cry8Ka5	88
4.5.1	<i>Digestibilidade in vitro</i>	88
4.5.2	<i>Determinação de estabilidade à temperatura</i>	88
4.6	Ensaio de toxicidade aguda (dose única) via oral da proteína Cry8Ka5 em camundongos	89
4.6.1	<i>Determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos</i>	89
4.6.2	<i>Determinação do peso úmido relativo dos órgãos e análises histopatológicas</i>	90
4.6.3	<i>Análise estatística dos dados do ensaio de toxicidade</i>	91
5	RESULTADOS	91
5.1	<i>Histórico de uso seguro</i>	91
5.2	Análises de bioinformática	91
5.3	Modo de ação e especificidade	107
5.4	Obtenção das proteínas Cry	110
5.5	Digestibilidade <i>in vitro</i> e estabilidade à temperatura	112

5.6	Toxicidade aguda (dose única) via oral em camundongos.....	116
6	DISCUSSÃO.....	127
7	CONCLUSÃO.....	137
	CAPÍTULO 3.....	139
1	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA/JUSTIFICATIVA.....	140
2	OBJETIVOS.....	142
2.1	Objetivos Gerais.....	142
2.2	Objetivos Específicos.....	142
3	MATERIAIS.....	143
3.1	Reagentes biológicos.....	143
3.1.1	<i>Células humanas.....</i>	<i>143</i>
3.1.2	<i>Microrganismos.....</i>	<i>143</i>
3.1.3	<i>Naúplios de Artemia sp.....</i>	<i>143</i>
3.1.4	<i>Animais de laboratório.....</i>	<i>144</i>
3.2.	Reagentes químicos e outros materiais.....	144
3.2.1	<i>Proteínas.....</i>	<i>144</i>
3.2.2	<i>Reagentes e materiais para expressão, purificação e quantificação das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.....</i>	<i>144</i>
3.2.3	<i>Reagentes e materiais para eletroforese e sequenciamento.....</i>	<i>145</i>
3.2.4	<i>Reagentes e materiais para testes in vitro.....</i>	<i>145</i>
3.3	Considerações sobre biossegurança.....	145
4	MÉTODOS.....	146
4.1	Produção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac em sistema heterólogo (<i>Escherichia coli</i>).....	146
4.2	Avaliação de cito- e genotoxicidade em linfócitos humanos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.....	146
4.2.1	<i>Coleta de sangue periférico e isolamento de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC).....</i>	<i>146</i>
4.2.2	<i>Atividade citotóxica em linfócitos humanos.....</i>	<i>147</i>
4.2.3	<i>Atividade genotóxica em linfócitos humanos.....</i>	<i>147</i>
4.3	Avaliação de Atividade Hemolítica das Proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.....	148
4.3.1	<i>Coleta de sangue humano e de animais de laboratório para isolamento e preparo de suspensão de eritrócitos.....</i>	<i>148</i>

4.3.2	<i>Atividade hemolítica em eritrócitos de humanos e animais de laboratório.....</i>	149
4.4	Análise de topografia de membrana celular via MFA.....	150
4.4.1	<i>Análise de dados.....</i>	151
4.5	Efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	153
4.6	Efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre microrganismos.....	153
5	RESULTADOS.....	154
5.1	Obtenção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.....	154
5.2.	Cito- e Genotoxicidade da Proteína Cry8Ka5.....	154
5.3	Atividade hemolítica.....	155
5.4	MFA.....	155
5.5	Efeitos sobre náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	163
5.6.	Efeitos sobre microrganismos.....	163
6	DISCUSSÃO.....	167
7	CONCLUSÃO.....	171
	CAPÍTULO 4.....	173
1	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA/JUSTIFICATIVA.....	174
2	OBJETIVOS.....	178
2.1	Objetivos Gerais.....	178
2.2	Objetivos Específicos.....	178
3	MATERIAIS.....	179
3.1	Reagentes biológicos.....	179
3.1.1	<i>Linhagens celulares e manutenção das culturas.....</i>	179
3.2	Reagentes químicos e outros materiais.....	179
3.2.1	<i>Proteínas.....</i>	179
3.2.2	<i>Reagentes e materiais para expressão, purificação e quantificação das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.....</i>	180
3.2.3	<i>Reagentes e materiais para eletroforese e sequenciamento.....</i>	180
3.2.4	<i>Reagentes e materiais para digestão in vitro e produção das amostras de peptídeos.....</i>	180
3.2.5	<i>Materiais para testes de viabilidade celular e exposição das células MCF-7 e Caco-2 às proteínas.....</i>	181
3.2.6	<i>Materiais para isolamento e purificação de RNA total.....</i>	181
3.3	Considerações sobre Biossegurança.....	181

4	MÉTODOS.....	182
4.1	Produção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac em sistema heterólogo (<i>Escherichia coli</i>).....	182
4.2	Produção das amostras de peptídeos de Cry8Ka5 e Cry1Ac.....	182
4.2.1	<i>Digestão sequencial in vitro das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.....</i>	<i>182</i>
4.2.2	<i>Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM).....</i>	<i>183</i>
4.2.3	<i>Digestão sequencial in silico das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.....</i>	<i>184</i>
4.2.4	<i>Alinhamento múltiplo de sequências.....</i>	<i>184</i>
4.3	Ensaio de viabilidade celular: determinação de dose subcitotóxica das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac e dos peptídeos/proteínas controle.....	185
4.4	Ensaio de exposição de células MCF-7 e Caco-2 às proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, às amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e aos demais peptídeos/proteínas controle para análise do perfil de expressão gênica.....	186
4.5	Isolamento, purificação, quantificação e pureza das amostras de RNA total.....	187
4.6	Hibridizações em microarranjos de DNA.....	188
4.6.1	<i>Controle de qualidade e normalização dos dados dos microarranjos.....</i>	<i>189</i>
4.7	Interpretação biológica.....	189
4.7.1	<i>Agrupamento hierárquico e análise de vias biológicas.....</i>	<i>189</i>
4.7.2	<i>Análises funcionais dos genes com expressão diferenciada.....</i>	<i>189</i>
4.7.3	<i>Análise de enriquecimento de genes (GSEA).....</i>	<i>190</i>
4.7.4	<i>Análises de Mapa Conectivo (“Connectivity Map analysis”) dos dados dos microarranjos.....</i>	<i>190</i>
5	RESULTADOS.....	191
5.1	Obtenção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.....	191
5.2	Obtenção das amostras de peptídeos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.....	191
5.2.1	<i>Identificação dos peptídeos nas amostras digeridas de Cry8Ka5 e Cry1Ac.....</i>	<i>191</i>
5.3	Viabilidade celular.....	192
5.4	Análises de expressão gênica.....	202
5.4.1	<i>Células MCF-7 indiferenciadas.....</i>	<i>202</i>
5.4.2	<i>Células Caco-2 diferenciadas.....</i>	<i>202</i>
5.5	Agrupamento hierárquico e análise de vias biológicas.....	205

5.5.1	<i>MCF-7</i>	205
5.5.2	<i>Caco-2</i>	206
5.6	Análises de Mapa Conectivo dos dados de MCF-7	209
5.7	GSEA	212
6	DISCUSSÃO	215
7	CONCLUSÃO	220
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	221
	REFERÊNCIAS	223

Capítulo 1

Revisão de Literatura:

**Do Desenvolvimento das Primeiras Plantas GM à Legislação Brasileira
para sua Comercialização**



1 Breve história da Biotecnologia: da domesticação e melhoramento genético de plantas e animais ao advento dos OGM

Data de aproximadamente 12 mil anos o surgimento das primeiras práticas agrícolas, com o início da domesticação de plantas e animais que culminou no abandono do estilo de vida nômade, até então, predominante, naquele período da história (FOODTIMELINE, 2012). No decorrer do processo de domesticação, características desejáveis foram selecionadas dentre numerosas modificações genéticas randômicas que ocorrem em cada geração. Características como maior produtividade e resistência a doenças já eram priorizadas nas primeiras experiências de melhoramento genético. Fatalmente, essa domesticação ocasionou numa perda de adaptação de várias espécies à vida selvagem, estando suas existências dependentes dos cuidados e práticas humanos. Curiosamente, hoje é difícil conseguir encontrar qualquer similaridade entre uma variedade agrícola e seus ancestrais selvagens devido à quantidade de cruzamentos feitos entre organismos detentores de caracteres de interesse (CHASSY, 2007). De acordo com alguns estudiosos e historiadores, essas manipulações indiretas de material genético ilustram os primeiros passos do que viria a ser chamado de “Biotecnologia”, somente em 1919, por Karl Ereky, um engenheiro húngaro (MURPHY; PERRELLA, 1993).

Neste contexto, um erro comum é pensar que a Biotecnologia somente lida com DNA (ácido desoxirribonucleico) e engenharia genética (MURPHY; PERRELLA, 1993). Segundo Costa e Costa (2009), a Biotecnologia abrange qualquer técnica onde são empregados organismos vivos, ou parte deles, para fabricar ou modificar produtos, melhorar plantas ou animais ou criar microrganismos para uso específico. Essa definição é apenas um exemplo das muitas já publicadas, mas que reflete bem a opinião de muitos pesquisadores e profissionais da área, e proporciona que se dimensione toda a importância da Biotecnologia para a vida humana.

Didaticamente, Verma *et al.* (2011) dividiram a história da Biotecnologia em três grandes períodos: Antigo, Clássico e Moderno. A Biotecnologia Antiga compreende o período pré-1800 D.C. A necessidade de alimento foi a grande motivadora das principais descobertas e desenvolvimentos desse período. O homem primitivo semeou as primeiras sementes de gramíneas e entendeu a importância da luz, água e outros requerimentos para o crescimento ótimo das plantas. Da mesma forma, domesticou animais selvagens e realizou os primeiros cruzamentos. Para estocar comida, desenvolveu métodos e utensílios para a preservação de alimentos. Posteriormente, aprendeu a usar renina, também conhecida como

quimosina (protease bastante abundante no abomaso de ruminantes), para produzir queijo, que é tido como um dos primeiros produtos diretos da biotecnologia. As leveduras começaram a ser manipuladas para produção de pão, vinagre e outros produtos fermentados como uísque, vinho, cerveja etc. O vinagre teve importante papel na preservação de alimentos devido o seu pH ácido. Portanto, a fermentação foi uma ferramenta poderosa para melhorar a condição de vida humana, embora o homem não conhecesse os princípios e agentes por trás disso.

A Biotecnologia Clássica compreende o período entre 1800 e quase a metade do século XX. Gregor John Mendel (1822-1884) estabeleceu as “Leis da Hereditariedade”, propondo que unidades internas de informação, posteriormente chamada de genes, fossem responsáveis pelas características observáveis nos seres vivos e estas fossem passadas de uma geração para outra. No mesmo período, Robert Brown (1773-1858) descobriu o núcleo nas células, enquanto, em 1868, Friedrich Miescher (1844-1895) relatou a existência da nucleína, que nada mais seria que os ácidos nucleicos. Em 1881, Robert Koch (1843-1910) descreveu colônias bacterianas crescendo em fatias de batata, enquanto seus colaboradores utilizaram pela primeira vez o ágar como suporte sólido para cultivo bacteriano. Outras descobertas importantes durante este período foram vacinas contra a varíola e a raiva desenvolvidas de forma independente por Edward Jenner (1749-1823) e Louis Pasteur (1822-1895), respectivamente. É importante acrescentar que, em 1864, Pasteur também desenvolveu um método famoso que usa calor para destruir microrganismos patogênicos em produtos alimentícios e que leva seu nome até hoje, a pasteurização (DU PONT, 2012). Posteriormente, Wilhelm Johannsen (1857-1927) descreveu o gene como o carreador da hereditariedade e, ainda, utilizou pela primeira vez os termos “genótipo” e “fenótipo”. Dado o acúmulo de descobertas científicas e seus trabalhos sobre o papel dos cromossomos na hereditariedade usando moscas da fruta (*Drosophila melanogaster*), T. H. Morgan (1866-1945) redefiniu os princípios de hereditariedade e publicou sua obra de referência “A Teoria do Gene”, em 1926. O encerramento dessa era da Biotecnologia foi marcado pela descoberta dos antibióticos, em particular da Penicilina, obtida do fungo *Penicillium notatum*, pelo britânico Alexander Fleming, em 1928. Ele ainda foi o descobridor da lisozima, uma enzima abundantemente encontrada nas lágrimas e no muco dos seres humanos.

A Biotecnologia Moderna deu seus primeiros passos a partir do fim da Segunda Guerra Mundial, em 1945. Já em 1953, James Watson (1928-) e Francis Crick (1916-2004) conseguiram elucidar a estrutura em dupla hélice do DNA a partir dos estudos de cristalografia de raios-X de Rosalind Franklin (1920-1958). Em 1961, foi definido o conceito de “Operon” por François Jacob (1920-) e Jacques Monod (1910-1976), enquanto César

Milstein (1927-2002) e Georges Köhler (1946-1995), em 1975, produziram os primeiros anticorpos monoclonais que, futuramente, revolucionariam o diagnóstico de doenças. A partir da compreensão de princípios básicos, os pesquisadores passaram a ter em mãos as ferramentas para a realização de grandes feitos e descobertas, outrora apenas possíveis na ficção científica. Har Khorana (1922-2011) foi capaz de sintetizar DNA *in vitro*, enquanto Kary Mullis (1944-) conseguiu desenvolver a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em 1983. Em posse desses e de outros avanços tecnológicos, cientistas foram capazes de produzir o primeiro Organismo Geneticamente Modificado (OGM) ou transgênico e de monitorar a transferência do DNA exógeno para a próxima geração. Anos depois, um fato atraiu a atenção do mundo, em 1996, Ian Wilmut (1944-) obteve o primeiro clone de um mamífero, a ovelha Dolly. Craig Venter (1946-), em 2000, coordenou a equipe que atuou no sequenciamento do genoma humano. Recentemente, o mesmo cientista demonstrou que um genoma sintético poderia replicar-se de forma autônoma.

Apesar de tantos avanços na Biotecnologia após a II Guerra Mundial, poucos eventos trouxeram tantos impactos diretos e imediatos à vida humana como o desenvolvimento dos OGM e, em especial, das plantas geneticamente modificadas (GM) ou transgênicas comuns à mesa da humanidade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define OGM como aqueles organismos em que o material genético foi alterado de uma forma que não acontece naturalmente (OMS, 2002). Em 1983, foi feita a primeira transferência de um gene exógeno para uma planta e, poucos anos depois, já foram realizados os primeiros testes de campo de culturas transgênicas de tabaco, tomate e batata, expressando genes de resistência a insetos, vírus e bactérias. Aproximadamente uma década depois, o tomate GM FlavrSavr®, desenvolvido pela Calgene e que apresentava maior tempo de vida de prateleira, foi aprovado para comercialização pelo *Food and Drug Administration (FDA)*, um órgão governamental dos Estados Unidos da América. Três anos depois, mais dezoito novos eventos foram aprovados pelo mesmo órgão (MURPHY; PERELLA, 1993). Apesar de toda a polêmica que envolve os alimentos transgênicos até os dias atuais, progressivamente aumenta sua área de cultivo, com o concomitante desenvolvimento e comercialização de novas variedades.

2 Desenvolvimento, produção e comercialização de plantas GM: ênfase ao papel do Brasil no mercado mundial

Em 2011, 29 países em todo o mundo utilizaram culturas transgênicas em suas lavouras. Nesses países, foram cultivados 160 milhões ha. com variedades GM, o que representou um aumento de 8,0% em relação a 2010, segundo o relatório anual do ISAAA – Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações Agrobiotecnológicas. Dentre as plantas GM cultivadas em 2011, a soja transgênica continua sendo a principal, chegando a 47% da área total cultivada. O milho, o algodão e a canola transgênicos são as outras três maiores culturas, compreendendo a 32, 15 e 6,5%, respectivamente, da área cultivada com plantas GM. Variedades de soja, milho, canola, algodão, beterraba e alfafa carreando genes exógenos que conferem tolerância a herbicidas foram as mais plantadas, ocupando ca. 60% de toda a área cultivada com transgênicos no mundo. Variedades com genes combinados (dois ou três genes), desenvolvidas através de piramidização ou fusão de genes, ocuparam 26% da área total plantada, superando a característica resistência a insetos que ocupou 15%. A preferência por variedades com genes combinados aumenta anualmente, refletindo a predileção dos produtores por esse tipo de tecnologia (JAMES, 2011).

Dos dez principais países que adotaram a engenharia genética na agricultura, oito são países em desenvolvimento (Brasil, Argentina, Índia, China, Paraguai, Paquistão, África do Sul e Uruguai) e juntos foram responsáveis por 48,43% (77,5 milhões de ha.) de toda a área global plantada com transgênicos, em 2011. O Brasil detém posição de destaque nesse grupo, pois além de ter apresentado a segunda maior extensão em área cultivada com transgênicos no mundo, mostrou também a maior expansão relativa de área coberta com culturas GM (20%), o equivalente a 30,3 milhões ha. Como resultado, o Brasil deteve 19% da área plantada com culturas GM no mundo, em 2011. Nas lavouras brasileiras foram cultivados soja, milho e algodão transgênicos (JAMES, 2011). Neste ínterim, é difícil mensurar o lucro total do Brasil com a adoção de transgênicos nos últimos anos, mas estima-se que no período de 2003 a 2008 o faturamento foi de aproximadamente U\$ 3 bilhões (JAMES, 2009). Contudo, para os três anos seguintes, esse valor deve ter sido bem maior, uma vez que a área plantada aumentou vertiginosamente, acompanhada do número de autorizações para liberação comercial de novas variedades de soja, milho e algodão transgênicos concedidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio (CTNBIO, 2012). Este órgão multidisciplinar do governo brasileiro será apresentado em maiores detalhes mais adiante.

Em concordância com as determinações da CTNBio, no Brasil é liberada a comercialização de 5 variedades de soja GM, dentre elas está a soja Roundup Ready® tolerante ao herbicida glifosato de amônio e desenvolvida pela multinacional Monsanto

Company, além de 3 outras variedades de soja tolerantes a herbicidas e 1 expressando genes combinados que conferem, ao mesmo tempo, tolerância a herbicida/resistência a insetos. Ademais, foi liberada a venda de 18 variedades de milho, 3 tolerantes a herbicidas, 5 resistentes a insetos e 10 tolerantes a herbicidas/resistentes a insetos, e, ainda, de 12 variedades de algodão, sendo 1 resistente a insetos, 5 tolerantes a herbicidas e 6 tolerantes a herbicidas/resistentes a insetos. Seguindo uma tendência mundial de substituição de variedades com somente um gene exógeno por variedades com genes exógenos combinados, a maioria das novas autorizações para liberação comercial concedidas pela CTNBio, desde o ano de 2010, foram para cultivares contendo pelo menos dois genes combinados. Isto caracterizou o início do plantio da “segunda geração” de transgênicos no Brasil (CTNBIO, 2012).

Outra aprovação recente da CTNBio que merece destaque, foi aquela do feijão (*Phaseolus vulgaris*) GM resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (“Bean Golden Mosaic Virus – BGMV”). O feijoeiro foi gerado a partir da inserção de um gene quimérico para expressão de um RNA (ácido ribonucleico) contendo um fragmento do gene *rep* (*ACI*) do vírus. Quando expresso, o RNA forma um grampo (RNA dupla fita) que é degradado pela maquinaria celular, gerando um fragmento que se liga ao gene *rep* viral que, por sua vez, está envolvido na replicação do vírus. Notavelmente, o feijoeiro transgênico foi inteiramente desenvolvido pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), demonstrando capacidade para desenvolver, aprovar e comercializar uma nova tecnologia em transgênicos (JAMES, 2011; CTNBIO, 2012).

Apesar da recente liberação comercial do feijoeiro transgênico desenvolvido pela Embrapa, é ainda marcante a dependência dos produtores locais por grãos GM desenvolvidos, avaliados e comercializados por multinacionais. Com exceção do feijão transgênico e de uma variedade de soja tolerante aos herbicidas do grupo das imidazolininas, desenvolvida pela Embrapa, em parceria com a multinacional BASF S.A., o mercado brasileiro de sementes transgênicas é dominado por cinco das maiores multinacionais do mundo em agrobiotecnologia, as norte-americanas Monsanto Company, Dow AgroSciences - The Dow Chemical Company e Du Pont – Pioneer, a alemã Bayer e a suíça Syngenta (CTNBIO, 2012). A razão para essa situação é devido principalmente a questões ideológicas e judiciais que atrasaram o início das atividades de pesquisa e desenvolvimento de OGM no país. Somente a partir de 2005, com a aprovação da lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, foram reestabelecidas as estruturas legais para a retomada das pesquisas com OGM e para a comercialização dos mesmos no país.

A Embrapa lidera as pesquisas com plantas transgênicas no Brasil. Essa empresa vem desenvolvendo vários cultivares GM de importância agrícola, destacando-se: variedades de cana-de-açúcar tolerantes ao estresse hídrico, de soja resistente ao ataque de nematoides e tolerante ao estresse hídrico, de alface resistente ao ataque de fungos, de tomate, batata e mamão resistentes ao ataque de vírus e, ainda, de café e algodão resistentes ao ataque de insetos-praga, dentre outros. Além disso, novos genes de origem animal, vegetal e bacteriana foram clonados e estão sendo expressos em sistemas heterólogos para obtenção de proteínas recombinantes, incluindo inibidores de proteases, inibidores de alfa-amilase e entomotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Tais moléculas apresentam atividades de interesse agrícola para as culturas de soja, algodão, café, dentre outras (EMBRAPA, 2010). Portanto, espera-se que nos próximos anos sejam liberadas para comercialização vários cultivares GM desenvolvidos completamente no Brasil e mais adequados as necessidades dos produtores locais.

3 *Bacillus thuringiensis* e suas δ -endotoxinas

B. thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva que ocorre naturalmente no solo, sendo caracterizada por sua habilidade de produzir inclusões parasporais contendo cristais durante a esporulação (SANAHUJA *et al.*, 2011; VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012). A formação desses cristais é conferida por genes presentes em um plasmídeo e que se tornam ativos na fase de esporulação (SANAHUJA *et al.*, 2011). Por sua vez, os cristais são compostos de uma ou mais proteínas denominadas de Cry (“Crystal proteins”) e Cyt (“Cytolytic proteins”), também chamadas de δ -endotoxinas (BRAVO *et al.*, 2007). A principal propriedade das δ -endotoxinas é a sua atividade entomotóxica seletiva. As proteínas Cry são especificamente tóxicas para os insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, e, ainda, para nematoides. Já as proteínas Cyt são essencialmente tóxicas para os insetos da ordem Diptera, mas também apresentam atividade citolítica contra uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo células de vertebrados (SÓBERON *et al.*, 2007; KUMAR; CHANDRA; PANDEY, 2008). Isto limita a utilização das proteínas Cyt por, potencialmente, oferecerem riscos à saúde humana e de outros organismos não-alvo, direcionando o foco das pesquisas em manejo de pragas para as toxinas Cry.

As propriedades inseticidas do *Bt* foram reconhecidas muitos anos antes da própria bactéria ser identificada. Há relatos que os esporos do *Bt* podem já ter sido utilizados no Egito Antigo. Contudo, somente em 1901, a bactéria foi isolada pelo biólogo japonês Shigetane Ishiwatari durante um estudo com bichos-da-seda afetados por uma doença que

causava colapso repentino. Dez anos depois, a mesma bactéria foi isolada por Ernst Berliner de mariposas-da-farinha (*Ephestia kuehniella*) doentes, na Alemanha, tendo renomeado o microrganismo como para *Bacillus thuringiensis*, nomenclatura que perdura até os dias atuais. Já as propriedades inseticidas dos cristais só foram constatadas quando lagartas mortas de mariposa-da-farinha foram encontradas preenchidas de esporos e cristais. Além disso, ficou claro que as lagartas somente morriam caso ingerissem os esporos e os cristais, pois apenas o contato superficial não causava mortalidade (SANAHUJA *et al.*, 2011). Desde então, as δ -endotoxinas, mas especialmente as proteínas Cry, têm sido alvo de numerosos estudos que abrangem desde diversidade, estrutura, evolução e modo de ação dessas proteínas até o desenvolvimento de novas aplicações como a produção de plantas transgênicas resistentes a insetos (BRAVO *et al.*, 2007).

As proteínas Cry pertencem a uma classe de toxinas bacterianas conhecidas como toxinas formadoras de poros (TFP), que são secretadas como proteínas solúveis em água e sofrem mudanças conformacionais a fim de inserir-se ou atravessar as membranas de seus hospedeiros. Dentre os dois grupos que compõem as TFP, as toxinas Cry de três domínios, bem como as colicinas, a exotoxina A e a toxina diftérica, são classificadas como toxinas α -helicoidais, em que as regiões de α -hélice são responsáveis pela formação do poro transmembrana. Em geral, bactérias produtoras de TFP secretam suas toxinas e estas interagem com receptores de superfície da célula hospedeira. Na maioria dos casos, TFP são ativadas por proteases do próprio hospedeiro e, depois, a ligação com o receptor induz a formação de uma estrutura oligomérica que é capaz de alocar-se na membrana. Finalmente, a inserção na membrana é seguida por um decréscimo no pH que induz a formação de um estado globular da proteína (PARKER; FEIL, 2005). No caso das Cry, condições alcalinas no trato digestório dos hospedeiros também são requeridas para garantir sua solubilidade e criar um microambiente ideal para ação das proteases. O requerimento de condições alcalinas e de proteases e receptores específicos explicam porque as Cry não são potencialmente nocivas para mamíferos, uma vez que estes possuem trato digestório ácido e ausência de receptores específicos (SANAHUJA *et al.*, 2011).

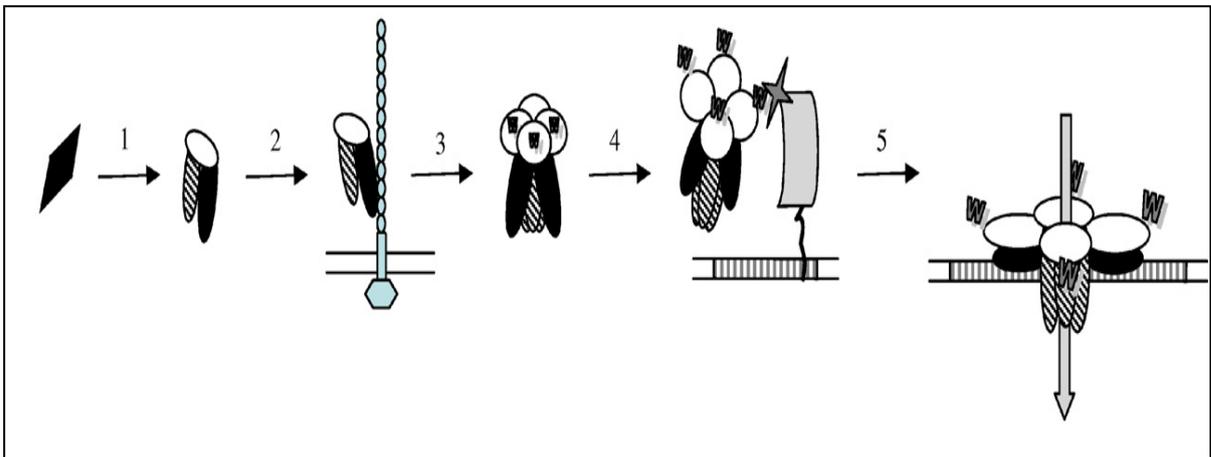
As proteínas Cry abrangem pelo menos 50 subgrupos com mais de 200 membros. A nomenclatura das toxinas Cry baseia-se essencialmente na identidade de sua sequência primária de aminoácidos com outras proteínas Cry conhecidas, mas pode-se levar em conta também sua atividade inseticida, no que diz respeito a quais são os insetos-alvo, a estrutura e o modo de ação da toxina (CRICKMORE *et al.*, 1998; VAN FRANKENHUYZEN, 2009). Os membros da família de três domínios, o maior grupo de proteínas Cry, são moléculas

globulares contendo três domínios estruturais conectados por ligações simples. Uma característica particular dos membros dessa família é a presença de protoxinas com dois tamanhos diferentes. A extensão C-terminal encontrada nas protoxinas está envolvida na formação do cristal, sendo clivada por proteases no intestino do inseto e, em seguida, liberando a toxina madura. A porção N-terminal é a toxina propriamente dita e que retém os três domínios (BOONSERM *et al.*, 2006; BRAVO *et al.*, 2007; SANAHUJA *et al.*, 2011).

O estudo da estrutura terciária de cinco proteínas Cry (Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry4Aa e Cry4Ba) através de cristalografia de raios-X revelou alto grau de similaridade entre a forma de organização dos três domínios, sugerindo um modo de ação similar para essa família de proteínas Cry (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001). O domínio I é um bloco de sete α -hélices, seis das quais são anfipáticas e estão circundando a sétima que é hidrofóbica, e é responsável pela inserção na membrana e formação do poro. O domínio II consiste de três folhas- β com regiões de “loop” expostas, enquanto o domínio III é uma β -sanduíche. Ambos estão envolvidos na ligação com o receptor (BOONSERM *et al.*, 2006; BRAVO *et al.*, 2007; SANAHUJA *et al.*, 2011).

O modelo mais aceito de ação das toxinas Cry de três domínios compreende várias etapas (BRAVO *et al.*, 2007; PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2009). O modo de ação das proteínas Cry têm sido mais bem caracterizado em insetos lepidópteros (BRAVO *et al.*, 2007), sendo, portanto, o modelo que será apresentado a seguir. As protoxinas Cry1A são ingeridas pelas larvas, solubilizadas no lúmen do intestino e clivadas por proteases do intestino médio do inseto para produzir toxinas monoméricas ativadas de 60 kDa. As toxinas ativadas se ligam a receptores presentes nas células do intestino médio das larvas. Em algumas larvas de lepidópteros, proteínas do tipo caderina apresentam elevada afinidade com as toxinas e funcionam como receptores primários. Propôs-se que a ligação das toxinas monoméricas de 60 kDa à caderina facilita a clivagem adicional pelas proteases da extremidade N-terminal das toxinas, incluindo a α -hélice 1 do domínio I. Esta clivagem induz o surgimento de formas oligoméricas da toxina. Os oligômeros aumentam a afinidade de ligação com os receptores secundários, que são proteínas ligadas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), aminopeptidase N e fosfatase alcalina. Após os oligômeros se ligarem aos receptores secundários, eles são inseridos em microdomínios de membrana, gerando poros na membrana apical de células do intestino médio que causam choque osmótico e a morte das células. O modo de ação das proteínas Cry contra larvas de lepidópteros está representado esquematicamente na Figura 1.1.

Figura 1.1 - Modo de ação de proteínas Cry, com ênfase no mecanismo de formação de poro no intestino de insetos-alvo. 1) Solubilização do cristal e clivagem proteolítica da protoxina, liberando a proteína ativa; 2) Proteína ativa se ligando ao receptor primário do tipo caderina; 3) Formação do oligômero (estrutura conhecida como pré-poro), aumento da afinidade da proteína aos receptores secundários; 4) Ligação do oligômero com os receptores secundários; 5) Interação entre a membrana da célula e o oligômero formado de proteínas ativas e a formação do canal iônico, causando efeitos citopatológicos que acarretam na lise celular. Figura adaptada de BRAVO *et al.* (2007)



As proteínas entomotóxicas do *Bt* são amplamente utilizadas na Agricultura e em Saúde Pública. Dentre as principais aplicações das toxinas *Bt*, três merecem destaque: 1. Controle de insetos desfolhadores em florestas; 2. Controle de mosquitos vetores de doenças; 3. Desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos (BRAVO *et al.*, 2007).

O primeiro uso comercial do *Bt* como inseticida foi em 1938. O produto apresentava-se como um dispersante aéreo chamado comercialmente de “Sporeine” (SANAHUJA *et al.*, 2011). Durante décadas, tentou-se fazer com que os inseticidas *Bt* para dispersão aérea ou uso tópico adequassem-se às exigências do mercado e, por fim, tornaram-se tão vantajosos para o agricultor quanto os pesticidas químicos tradicionais. Os inseticidas *Bt* são mais seguros, mais seletivos, potentes e biodegradáveis. Contudo, algumas desvantagens, tais como baixa atividade residual (sensibilidade à luz UV e às condições climáticas, ambiente químico foliar desfavorável e presença de proteases) e toxicidade restrita a algumas fases da vida do inseto, criaram os alicerces para a justificativa de incorporação das proteínas Cry aos tecidos vegetais através da transgenia. Atualmente, um dos principais usos dos “sprays” de *Bt*, linhagem HD1, que produz Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, é no controle de lepidópteros desfolhadores de florestas de coníferas na América do Norte. Já para o controle de mosquitos vetores de doenças humanas o *Bt* var. *israelensis* (*Bti*) tem sido o mais utilizado. O *Bti* é aplicado em cursos d’água e em locais com água estagnada para combate, especialmente, das larvas de *Aedes aegypti* (vetor da dengue), de *Simulium damnosum* (vetor da oncocercose) e de algumas espécies de *Anopheles* (vetores da malária). As toxinas do *Bti* são codificadas por um megaplasmídeo chamado p*Btoxis* que contém os genes para quatro proteínas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa) e duas Cyt (Cyt1Aa e Cyt2Ba). Algumas formulações de *Bti* incluem também *B. sphaericus* (SANAHUJA *et al.*, 2011).

O desenvolvimento das plantas transgênicas expressando toxinas Cry tem sido um dos maiores avanços na substituição de inseticidas químicos por alternativas menos danosas ao meio ambiente (SANAHUJA *et al.*, 2011). Além disso, a adoção das primeiras variedades *Bt*, em 1996, é considerada como um marco na biotecnologia agrícola, que proporcionou uma revolução social e ambiental no campo (KUMAR; CHANDRA; PANDEY, 2008). Maiores detalhes sobre o desenvolvimento e a adoção dos primeiros eventos *Bt*, bem como a situação atual desses produtos no mercado agrobiotecnológico serão discutidos no tópico a seguir.

4 Plantas *Bt*: trajetória comercial, benefícios, resistência de insetos e algodão *Bt*

Por volta da metade da década de 1980, a expressão de genes *Bt* em tomate e tabaco forneceram os primeiros exemplos de plantas GM resistentes ao ataque de insetos (BARTON; WHITELEY; YANG, 1987; VAECK *et al.*, 1987). No entanto, essas primeiras plantas apresentavam baixos níveis de expressão das proteínas recombinantes que foram atribuídos a uma diferença no conteúdo de GC (Guanina e Citosina) no DNA do *Bt* e da planta, aliada a uma preferência por determinados códons. Modificações na sequência dos genes *cryIAb* e *cryIAc*, primeiros genes *Bt* usados para transformação, tais como o aumento do conteúdo de GC, contribuíram para um aumento de 100 vezes da presença de Cry nas proteínas solúveis totais (PST), o que foi equivalente a 0,02%. Mesmo assim, os níveis de expressão ainda não eram adequados para o controle de pragas, o que levou a novas modificações, tais como o uso de promotores e poliadenilação mais eficientes, sinais de terminação e inclusão de íntrons heterólogos nos vetores de expressão. Isto integrado ao uso de genes *cry* sintéticos, otimizados para expressão em plantas, elevou os níveis de expressão das Cry para 0,2-1% do total de proteínas solúveis (KOZIEL *et al.*, 1993), podendo chegar a 5% quando os genes *cry* foram introduzidos no genoma cloroplastidial (MCBRIDE *et al.* 1995).

Logo após conseguir excelentes resultados com as plantas *Bt* em laboratório, foram realizados os primeiros testes de campo com tabaco *Bt* nos Estados Unidos da América e na França (HOFFMAN *et al.*, 1992). Posteriormente, seguiram-se os testes de campo com plantas de batata transgênica expressando Cry3A do *Bt var. tenebrionis*. As plantas de batata Cry3A mostraram-se mais resistentes ao ataque do besouro-da-batata (*Leptinotarsa decemlineata*) do que plantas de batatas convencionais tratadas com o “spray” de uso tópico, contendo a mesma Cry (PERLAK *et al.*, 1993). Concomitantemente, foram realizados testes de campo com algodão, milho e arroz, todos expressando toxinas *Bt* (SANAHUJA *et al.*, 2011).

Em 1995, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (US EPA) aprovou os primeiros registros de batata, milho e algodão portando genes *Bt*. A Monsanto Company foi a primeira empresa a comercializar esses cultivares *Bt*. Dentre os quais, estavam as variedades de algodão Bollgard e Ingard (eventos 531, 757 e 1076), expressando a toxina Cry1Ac que confere resistência à lagarta-das-maçãs do algodoeiro (*Heliothis virescens*), a lagarta do algodão (*Helicoverpa armigera*) e a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) (MENDELSON *et al.*, 2003; GATEHOUSE *et al.*, 2011;

SANAHUJA *et al.*, 2011). Com exceção do algodão *Bt*, as primeiras variedades de milho e batata *Bt* tiveram sua produção descontinuada ou foram substituídas por outros eventos. Poucos anos após o início do plantio de variedades *Bt*, já era possível perceber os impactos positivos da tecnologia dos transgênicos *Bt* na agricultura e para o meio ambiente (SANAHUJA *et al.*, 2011).

Neste contexto, um grande número de relatos acumula-se na literatura científica sobre os benefícios diretos da adoção dos transgênicos *Bt* para o homem, para a agricultura e para o meio ambiente. Dentre os principais benefícios, destacam-se: 1. Redução da aplicação de inseticidas de amplo espectro, com consequente diminuição dos efeitos sobre insetos benéficos, predadores naturais e outros organismos não-alvo (HEAD *et al.*, 2001; CARPENTER *et al.*, 2002; KUMAR; CHANDRA; PANDEY, 2008; BROOKES; BARFOOT, 2010); 2. Decréscimo dos casos de intoxicação aguda e crônica de humanos causados por inseticidas sintéticos; 3. Melhoria dos rendimentos dos produtores devido ao aumento da produtividade, do controle de longa duração das pragas-alvo e da redução dos custos com os inseticidas e sua aplicação; 4. Melhoria da qualidade de vida das pessoas a partir da disponibilização de mais alimentos e, conseqüentemente, redução da subnutrição (LEWIS *et al.*, 2010; RAYBOLD; QUEMADA, 2010); 5. Redução dos impactos sobre o meio ambiente a partir da redução da emissão de gases poluentes por máquinas agrícolas usadas na aplicação dos pesticidas, diminuição do consumo de água usada para dispersão do inseticida e redução do desmatamento (JAMES, 2002; KUMAR; CHANDRA; PANDEY, 2008). 6. Proteção dos grãos estocados dos insetos-praga (GILLES *et al.*, 2000); e, 7. Diminuição dos níveis de micotoxinas devido à redução de fungos patogênicos associados à praga do milho *Ostrinia nubilalis* (MUNKVOLD; HELLMICH; RICE, 1999; WU, 2006).

Os efeitos sobre organismos não-alvo, especialmente sobre espécies de insetos benéficos e predadores naturais das pragas-alvo das plantas *Bt*, é um dos temas mais debatidos entre os defensores e os oponentes da tecnologia *Bt* para o controle de pragas agrícolas. Como qualquer tecnologia de manejo de pragas, culturas transgênicas expressando genes *Bt* podem apresentar um risco para organismos não-alvo, particularmente insetos benéficos que são taxonomicamente próximos dos insetos-alvo (OBRYCKI *et al.*, 2001). No entanto, quando uma nova tecnologia é avaliada quanto aos seus riscos potenciais, é importante que sejam utilizados controles adequados e relevantes para fins comparativos. Atualmente, poucos estudos têm sido planejados a partir da comparação direta da tecnologia GM com as estratégias convencionais de controle de pragas (GATEHOUSE *et al.*, 2011). Apesar desse equívoco nos desenhos experimentais como sugerido por alguns pesquisadores,

a maioria dos estudos que investigou os efeitos das toxinas *Bt* e/ou das plantas *Bt* sobre organismos não-alvo não detectou efeitos significativos sobre artrópodes não-alvo, sejam eles insetos benéficos, predadores ou parasitas naturais (ROMEIS; MEISSE; BIGLER, 2006; CHEN *et al.*, 2008; SANAHUJA *et al.*, 2011).

Mesmo com os excelentes resultados no controle de lepidópteros pelas variedades de algodão *Bt* expressando somente um gene *cry*, uma nova geração de plantas de algodão carregando dois genes *Bt* na mesma planta entrou no mercado, em 2002. A toxina Cry1Ac foi combinada em uma única variedade com a toxina Cry1F no algodão Widestrike[®], desenvolvido pela Dow Agrosiences ou a Cry2Ab2 no Bollgard II[®] da Monsanto Company. Ambos são particularmente ativos contra um número maior de lepidópteros-praga (KUMAR; CHANDRA; PANDEY, 2008; GATEHOUSE *et al.*, 2011). De fato, um dos objetivos do uso de genes múltiplos ou da piramidização de genes é ampliar a resistência da planta contra um maior número de pragas. Contudo, quando combinados genes que expressam proteínas inseticidas com diferentes mecanismos de ação, objetiva-se também a redução da probabilidade de desenvolvimento de resistência devido a mutações em insetos. Dessa forma, para debelar os efeitos tóxicos de uma planta transgênica expressando duas ou mais proteínas inseticidas recombinantes com diferentes modos de ação, múltiplas mutações deveriam ocorrer simultaneamente em um único inseto (KUMAR; CHANDRA; PANDEY, 2008). São inúmeros os mecanismos de resistência de insetos às toxinas *Bt*, mas é comum a todos a interferência em alguma etapa no modo de ação das mesmas. No entanto, alterações na ligação das toxinas aos receptores no intestino do inseto têm-se mostrado o mecanismo de resistência mais comum (FERRÉ; VAN RIE; MACINTOSH, 2008).

De fato, a principal ameaça à longevidade do uso das toxinas *Bt* na agricultura é a evolução de resistência em insetos-praga (TABASHNIK, 1994; GOULD, 1998). Diferentes linhagens de insetos-praga têm apresentado resistência às toxinas *Bt* em condições de laboratório e algumas pragas desenvolveram resistência aos “sprays” *Bt* no campo ou em casas de vegetação (TABASHNIK, 1994; FERRÉ; VAN RIE, 2002; JANMAAT; MYERS, 2003; TABASHNIK; DENNEHY; CARRIERE, 2005; XU; YU; WU, 2005). Além disso, já existem inúmeros relatos científicos sobre a resistência de pelo menos nove espécies de insetos-alvo às plantas *Bt* (VAN RENSBURG, 2007; TABASHNIK *et al.*, 2008; TABASHNIK *et al.*, 2009; BAGLA, 2010; CARRIERE; CROWDER; TABASHNIK, 2010; DOWNES; PARKER; MAHON, 2010; STORER *et al.*, 2010; ALCANTARA *et al.*, 2011; DHURUA; GUJAR, 2011; GASSMANN *et al.*, 2011; HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011; ZHANG *et al.*, 2011; WAN *et al.*, 2012). Dentre essas, podemos citar as pragas do

algodão *H. armigera* e *P. gossypiella*, para quais já foram descritas populações resistentes ao algodão *Bt* expressando Cry1Ac em diferentes regiões da China (TABASHNIK; WU; WU, 2012). Por outro lado, os cultivares de algodão transgênico portando dois ou mais genes *Bt* têm-se mostrado bastante eficazes e, apesar de sua recente introdução no mercado, não existem relatos de resistência a esses novos cultivares (BRÉVAULT *et al.*, 2009; AN *et al.*, 2010).

Genes *cry* também podem ser combinados numa mesma planta, pelos menos experimentalmente, com outros genes entomotóxicos de origens diferentes. É comum a combinação numa mesma planta de genes *cry* com inibidores de proteases, quitinases, toxinas Cyt ou com peptídeos do receptor de caderina CR12-MPED a fim de aumentar sua toxicidade, espectro de ação contra pragas e/ou evitar o desenvolvimento de resistência (PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2009). Na China, cultivares de algodão *Bt* expressando Cry1Ac junto com um inibidor de tripsina de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) foram liberados para comercialização em 2000 e, já em 2005, correspondiam a 15% de todo o algodão plantado no país. A principal razão para o desenvolvimento dessas variedades foi barrar o surgimento da resistência ao algodão Cry1Ac (SONG; WANG, 2000; HE; WANG; ZHANG, 2009).

Quando se quer reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência em populações de insetos-praga, é importante ressaltar que os genes combinados ou piramidizados devem possuir diferentes mecanismos de ação contra o inseto-alvo para que o arranjo gênico seja eficaz por um longo período. Além disso, outras estratégias próprias do manejo integrado de pragas devem ser adotadas para assegurar o uso prolongado das culturas *Bt*. As demais medidas a serem tomadas são: 1. Somente liberar transgênicos *Bt* que possuam elevada expressão dos genes *cry*; 2. Não cultivar muitas variedades *Bt* de uma mesma espécie vegetal e garantir a disponibilidade de áreas de refúgio plantadas com variedades não-*Bt*; e, 3. Implementar um programa de monitoramento de resistência (COHEN; GOULD; BENTUR, 2000). A aplicação dessas estratégias pode garantir a eficácia das plantas *Bt* por tempo indeterminado, pois, mesmo, para os eventos piramidizados existe a possibilidade de desenvolvimento de resistência nos insetos caso não sejam empregadas medidas adequadas de manejo (IVES *et al.*, 2011).

Segundo o ISAAA (2012), já foram desenvolvidos para comercialização em todo o mundo 36 variedades de algodão transgênico resistente a insetos, sendo quase todas portadoras do gene *cry1Ac* sozinho ou combinado à outra toxina *Bt*. Outro fato interessante, é que, com exceção da variedade de algodão transgênico SGK321 comercializado na China que expressa a toxina Cry1Ac combinada ao inibidor de tripsina do feijão-caupi (CpTI), não

existe no mercado de sementes nenhumo cultivar transgênico resistente ao ataque de insetos coleópteros. Como será discutido adiante, esse fato tem implicações diretas sobre o cultivo do algodão no Brasil, uma vez que a principal praga a ser combatida nas lavouras locais é um coleóptero, o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*).

5 O algodão, *Gossypium hirsutum* Linnaeus (Malvaceae), e o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera:Curculionidae)

Até o presente momento, são conhecidas 50 espécies de algodão que são classificadas como pertencentes ao gênero de dicotiledôneas *Gossypium*, família Malvaceae. Dessas espécies, 45 são diploides, dividindo-se em três grupos geográficos e correspondendo aos subgêneros *Sturtia*, *Houzingenia* e *Gossypium*. As outras cinco espécies são tetraploides e incluídas no subgênero *Karpas*. Dentre as 50 espécies, apenas quatro espécies (duas diploides e duas tetraploides) têm importância comercial, com destaque para a espécie tetraploide *G. hirsutum* que teve seu centro de origem na América Central e hoje corresponde a 80% de toda área cultivada no mundo com algodão.

Atualmente, o algodão é a fibra vegetal mais plantada no mundo, sendo cultivada comercialmente em regiões tropicais e temperadas de mais de 60 países, cobrindo uma área total de 35 milhões ha. Os cinco maiores produtores em ordem decrescente são China, Índia, EUA, Paquistão e Brasil. Apesar disso, nem sempre o Brasil ocupou uma posição de destaque no “ranking” mundial dos maiores produtores do algodão (ABRAPA, 2012a). O país viveu um forte período de desestímulo no setor algodoeiro entre 1985 e 1996, causado, principalmente, pela disseminação do bicudo-do-algodoeiro, o que provocou uma redução drástica da área plantada (de 2.250.000 para 745.000 ha cultivados) e da produção (de 2.700.000 para 950.000 toneladas de algodão em caroço) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2001). Entretanto, a partir de 1997, a atividade retomou seu crescimento. Dentre os principais fatores responsáveis pela recuperação da cotonicultura no Brasil destacam-se: o deslocamento do eixo produtor da fibra das regiões Sul-Sudeste para o Centro-Oeste; promoção de condições favoráveis para o desenvolvimento da cultura; investimento em pesquisa; utilização de variedades mais bem adaptadas às condições climáticas e do solo, bem como mais produtivas; estímulo à competitividade e a busca por um padrão de excelência; e, por fim, o uso de modernas técnicas de cultivo (BELTRÃO, 1999; ABRAPA, 2012b). Todas essas ações resultaram em um aumento vertiginoso na produtividade de algodão no Brasil, porém sem aumentar o tamanho da área

plantada. Ao passo que a área plantada diminuiu de quase 4.500.000 para 1.500.000 ha, a produtividade aumentou de 200 para 1.400 kg de pluma de algodão/ha (ABRAPA, 2012a). Algo que é extremamente positivo para o meio ambiente.

A prosperidade atual da cotonicultura no Brasil pode ser medida através das últimas estatísticas publicadas pela Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (ABRAPA). O cálculo do Produto Interno Bruto (PIB) da cadeia produtiva do algodão para o ano agrícola de 2011/2012 alcançou um montante fabuloso, 19,19 bilhões de dólares. Já o valor obtido somente com a exportação da pluma de algodão foi de quase um bilhão de dólares. Além disso, apenas a movimentação financeira com os produtos primários do algodão (pluma, caroço e fibrilha) correspondeu a 2,3% do PIB do agronegócio no Brasil (ABRAPA, 2012b).

Mesmo com a recuperação do setor algodoeiro no Brasil, a cultura do algodão ainda se encontra susceptível ao ataque de um grande número de insetos-praga. Apesar de existirem flutuações populacionais, grandes infestações podem provocar sérios prejuízos à cultura, ocasionando danos a todas as partes da planta, afetando assim sua produtividade (SANTOS, 2001). Essa abundância de pragas nas lavouras de algodão pode ser explicada, em parte, pela presença de inúmeras glândulas, denominadas nectários, que produzem uma secreção líquido-resinosa açucarada que torna o algodão atrativo aos insetos e, por conseguinte, gera inúmeros gastos com defensivos. As despesas com inseticidas sintéticos na produção de algodão representam a maior parcela dos custos de produção, aproximadamente 25% dos gastos totais. Dentre os principais insetos-praga que atacam a cultura do algodão, destacam-se: o bicudo-do-algodoeiro, *A. grandis* (Coleoptera: Curculionidae); a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae); a lagarta-rosada, *P. gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae); a lagarta-das-maçãs, *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) e o curuquerê-do-algodoeiro, *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) (GALLO *et al.*, 2002).

Entre as pragas listadas acima, o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*) é considerada a mais danosa à cotonicultura no continente americano, contribuindo significativamente para a inviabilização dessa cultura (SILVIE; LEROY, 2001). Pertencente à família Curculionidae, subfamília *Anthonominae*, caracteriza-se por utilizar os botões florais, flores e frutos do algodoeiro como fonte de alimento e local para o desenvolvimento de suas formas imaturas, causando prejuízos diretos à produção e comercialização da fibra (pluma) de algodão (HAYNES; SMITH, 1992). Dessa forma, protegidos no interior das estruturas reprodutivas do algodoeiro, os ovos, larvas e pupas de *A. grandis* ficam protegidos da ação da maioria dos agentes de controle, como inimigos naturais e inseticidas. Já no estágio adulto, o inseto

abandona o abrigo vegetal começando sua vida livre (DEGRANDE, 1991), quando se alimenta e reproduz para iniciar um novo ciclo. Caso o inseto não seja combatido, os prejuízos à lavoura podem chegar a 100% da produção (SANTOS, 2001).

O uso de inseticidas sintéticos é a forma disponível mais eficiente e mais utilizada no controle do bicudo-do-algodoeiro (WOLFENBARGER; HAMED; LUTTRELL, 1997; MIRANDA, 2006). Contudo, esse controle químico é bastante oneroso e pode causar impactos negativos ao meio ambiente (MARTINS *et al.*, 2007). Outros métodos de combate empregados são o controle biológico com o fungo *Beauveria bassiana* (WRIGHT; CHANDLER, 1991; SILVA, 2001), o uso de feromônios (GALLO *et al.*, 2002), o controle físico através do uso de armadilhas (RAMALHO, 2003) e o manejo integrado de pragas (LUTTRELL *et al.*, 1994). Apesar de todos esses esforços, o estilo de vida endofítico do bicudo parece ser o grande obstáculo a ser superado para garantir um controle mais eficiente desse importante inseto-praga. Neste contexto, uma alternativa mais econômica, segura e, potencialmente, eficaz ao uso dos inseticidas sintéticos seria o desenvolvimento de plantas de algodão transgênico resistentes ao ataque do bicudo-do-algodoeiro. Para esse fim, genes *cry* de *Bt* têm sido amplamente utilizados para o desenvolvimento de cultivares *Bt* resistentes a insetos, inclusive de vários cultivares de algodão como descrito anteriormente (Item 4). A adoção do algodão expressando proteínas Cry ativas contra insetos lepidópteros no México e nos Estados Unidos da América resultou em um decréscimo de 50% na aplicação de inseticidas. Na Argentina, esse percentual de redução foi ainda maior, 65% (SANTOS *et al.*, 2003). No entanto, de acordo com a realidade da cotonicultura no Brasil, a comercialização do algodão *Bt* resistente a lepidópteros trouxe poucos benefícios aos produtores locais, uma vez que na maior parte do país a principal praga a ser combatida é o bicudo. Portanto, faz-se urgente a busca por novas moléculas Cry em estirpes brasileiras de *Bt* ativas contra coleópteros, juntamente à adoção de novas tecnologias como a piramidização de genes para a geração de novas variedades de algodão *Bt* mais adequadas às necessidades dos cotonicultores brasileiros.

6 A entomotoxina mutante Cry8Ka5 e a produção do algodão *Bt* resistente ao bicudo

No âmbito da pesquisa de alternativas mais eficazes para o controle dos insetos-praga de maior importância para as lavouras brasileiras, vários estudos têm sido realizados a fim de descobrir novas proteínas Cry em cepas nativas de *B. thuringiensis* (MONNERAT *et al.*, 2007; SILVA-WERNECK; ELLAR, 2008; GOBATTO *et al.*, 2010; KNAAK *et al.*,

2010). Especificamente, esforços têm sido feitos na busca de cepas *Bt* produtoras de toxinas Cry3, Cry8, Cry1B e/ou CryII, reconhecidamente ativas contra coleópteros e, conseqüentemente, potenciais candidatas a serem utilizadas como ferramentas para o desenvolvimento de um algodão transgênico resistente ao bicudo-do-algodoeiro (MARQUEZ; DIAS, RIBEIRO, 2000; GROSSI-DE-SÁ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2008). Dentre essas foi detectada a cepa de *B. thuringiensis* S811, portadora dos genes *cryII* e *cry8*, que apresentou atividade contra *A. grandis* (MARTINS *et al.*, 2007). Posteriormente, o gene *cry8Ka1* foi isolado, mas a proteína recombinante Cry8Ka1 mostrou-se apenas moderadamente tóxica contra as larvas do coleóptero, o que não seria suficiente para obtenção de um cultivar de algodão transgênico eficaz no controle desse inseto-praga (GROSSI-DE-SÁ *et al.*, 2009; NAKASU *et al.*, 2010). Contudo, técnicas de evolução molecular *in vitro* podem ser utilizadas para o desenvolvimento de moléculas com atividade melhorada, visando sua aplicação, principalmente, no melhoramento de plantas e na indústria farmacêutica (YUAN *et al.*, 2005).

A técnica de “DNA shuffling” é uma das mais aplicadas para gerar mutações em uma ou mais sequência(s) gênica(s), sendo utilizada para a construção de bibliotecas combinatórias de genes variantes (ABÉCASSIS; POMPON; TRUAN, 2000; YUAN *et al.*, 2005; ROSIC *et al.*, 2007). A metodologia da técnica resume-se basicamente na fragmentação aleatória do gene de interesse (30-50pb) e a recombinação deste produto em PCRs, permitindo a amplificação da população de genes variantes. As variantes geradas por essa técnica a partir de um único gene podem apresentar apenas mutações pontuais, enquanto que bibliotecas geradas a partir de dois ou mais genes homólogos podem apresentar variantes constituídas de fragmentos dos diferentes genes parentais, assim como mutações pontuais (ZHAO; ARNOLD, 1997).

Para selecionar novas moléculas, a partir de bibliotecas de genes variantes, muitos estudos têm utilizado a técnica de apresentação em fagos (“Phage display”) (ANDRIS-WIDHOPF *et al.*, 2000; STOOP *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2007). Nesta técnica, a biblioteca de variantes é apresentada em fagos filamentosos que passam a ser chamados de fagos de fusão, por apresentarem sua proteína III fusionada à nova proteína heteróloga. A seleção é realizada por meio de incubação dos fagos de fusão com a proteína ligante fixa em um suporte. Os fagos de fusão com afinidade pelo ligante são recuperados e utilizados em experimentos posteriores de caracterização da nova molécula. Ishikawa *et al.* (2007) descreveram um novo sistema para evolução dirigida de proteínas de *B. thuringiensis* (Cry1A) combinado com “Phage display” e utilizando o fago T7 no processo de seleção. Neste

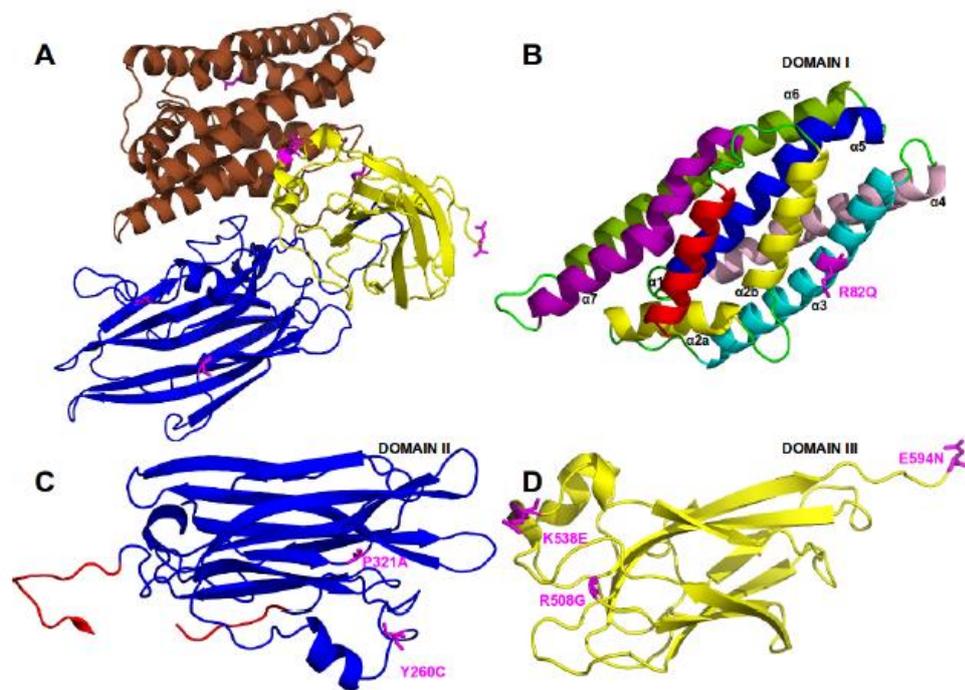
trabalho foi demonstrado o potencial da metodologia para desenvolver toxinas inseticidas mais ativas, a partir de toxinas com baixa atividade.

Assim, utilizando a técnica de “DNA shuffling” aliada à seleção de proteínas por “Phage display”, Oliveira *et al.*, (2011) geraram uma biblioteca combinatória contendo 10^5 variantes do gene *cry8Ka1* (2001 pb) e, em seguida, selecionaram variantes com atividade melhorada contra *A. grandis*. As variantes foram selecionadas pela afinidade das mesmas aos receptores presentes nas membranas das células do intestino do bicudo-do-algodoeiro. Após expressão em fago, as proteínas variantes de Cry8Ka1 foram testadas em bioensaios contra larvas do inseto-alvo e sequenciadas. Os resultados dos bioensaios mostraram variantes mais efetivas contra a praga-alvo, quando comparadas com a proteína original Cry8Ka1. Dentre as variantes mais efetivas, estava o mutante Cry8Ka5 que foi subclonado no vetor de expressão em bactéria. A proteína mutante purificada (Cry8Ka5) apresentou atividade entomotóxica três vezes mais potente (CL_{50} 2,83 μ g/ml) do que aquela da proteína original (Cry8Ka1).

A partir de estudos estruturais, Oliveira *et al.* (2011) demonstraram que o gene mutante *cry8Ka5* (1947 pb) codifica uma proteína de 649 resíduos de aminoácidos. A comparação da sequência primária de aminoácidos da toxina parental Cry8Ka1 com a sua variante Cry8Ka5 apontaram a substituição de apenas seis resíduos distribuídos ao longo dos três domínios estruturais típicos das toxinas Cry (FIGURA 1.2). Uma substituição foi observada no Domínio I (R82Q; dentro da α -hélice 3), duas substituições no Domínio II (Y260C e P321A) e três no Domínio III (R508G, K538E e E594N). Além disso, foi observada uma deleção de 16 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal da Cry8Ka5, o que foi responsável pelo tamanho menor dessa toxina quando comparada à parental Cry8Ka1 (668 resíduos de aminoácidos). O modelo estrutural proposto para Cry8Ka (Cry8Ka1 e Cry8Ka5) nesse trabalho revelou os três domínios conservados das toxinas Cry e demonstrou que todas as mutações geradas ficaram restritas à superfície da molécula e expostas ao solvente. Os autores sugeriram que estudos posteriores envolvendo interações toxina-receptor poderão revelar as diferenças de ligação e o aumento da toxicidade relacionado aos resíduos substituídos nos três domínios da mutante Cry8Ka5. Portanto, a estratégia de “DNA shuffling” aplicada ao melhoramento da atividade da toxina Cry8Ka1 foi capaz de gerar mutações positivas, sem causar mudanças conformacionais na variante Cry8Ka5 que pudessem afetar sua estabilidade estrutural. Dada a atividade melhorada da mutante Cry8Ka5 contra *A. grandis*, o gene *cry8Ka5* foi considerado potencialmente útil para obtenção de plantas de algodão GM resistentes ao ataque do bicudo-do-algodoeiro.

Assim, a entomotoxina mutante Cry8Ka5 está sendo utilizada em programas de melhoramento de plantas de algodão visando à obtenção de plantas resistentes ao bicudo-do-algodoeiro, *A. grandis* (OLIVEIRA, 2008). Além do algodão, outras culturas de importância econômica e que são alvo do ataque de coleópteros-praga também estão sendo transformadas com a proteína Cry8Ka5 para obtenção de plantas *Bt* resistentes a esses insetos. Contudo, existe a preocupação em relação às questões de biossegurança e bioética envolvendo o desenvolvimento de transgênicos. Para responder em parte a essas questões, os estudos de biossegurança alimentar tornaram-se indispensáveis à liberação para comercialização de OGM como será discutido a seguir.

Figura 1.2 - Diagramas de fita do modelo estrutural sugerido para Cry8Ka1, indicando as posições de substituição de aminoácidos na toxina Cry8Ka5. A) A molécula inteira mostrando os três domínios (domínio I de cor castanha, II na cor azul e III na cor amarela). Os resíduos substituídos na Cry8Ka5 estão em destaque na cor magenta; B) o Domínio I composto por oito α -hélices. A posição da mutação R82Q é indicada na α -hélice 3; C) As folhas β anti-paralelas do Domínio II, indicando dois resíduos substituídos na toxina Cry8Ka5: Cys e Ala nas posições 260 e 321, respectivamente; D) As folhas β “jelly-roll” do Domínio III, os três outros resíduos mutados: Gly na posição 508, Glu na 538 e Asn em 594. Adaptado de Oliveira *et al.* (2011)



7 Biossegurança: conceito, definições e a legislação brasileira e suas competências

Em poucas palavras, o conceito de biossegurança refere-se claramente à segurança da vida. De acordo com a etimologia da palavra, biossegurança (“biosafety”) é formada pelos seus componentes: “bio” (raiz grega), que significa vida, e segurança, que se refere à qualidade de ser seguro, livre de dano. O verbete “biossegurança”, incluído na edição de 1999 do Dicionário Aurélio, denota “segurança da vida”, e deve ser usado em situações não intencionais (COSTA; COSTA, 2009).

A biossegurança é um campo de conhecimento interdisciplinar com uma forte base filosófica em ética e bioética (GARRAFA; PESSIN, 2004), e com múltiplos recortes e interfaces, cujos limites são amplos e estão em constante construção (POSSO *et al.*, 2004). Isso aponta para o fato de que a biossegurança ainda não é uma ciência, exatamente por não ter um conjunto de conhecimentos próprios da sua área (COSTA; COSTA, 2012). Em decorrência de sua própria multiplicidade, a biossegurança pode ser definida em vários contextos. A definição que mais se aproxima da temática abordada neste trabalho foi aquela dada pela “Food and Agriculture Organization” (FAO, 2001), que afirma que: “Biossegurança são procedimentos de prevenção de riscos à saúde humana e ambiental, oriundos da pesquisa e comércio de organismos geneticamente modificados”. Outra definição bastante utilizada nos livros-texto e que engloba aquela da FAO é a de Teixeira e Vale (1996), que diz o seguinte: “Biossegurança é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação dos riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, riscos que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, das plantas e do meio ambiente”.

Outro termo que merece uma explanação é “biossegurança alimentar” (“food safety”, em inglês). Dentro do contexto de segurança de OGM e seus derivados, a biossegurança alimentar lida com todas as questões referentes à segurança de consumo de alimentos geneticamente modificados (AGM) e seus derivados por humanos e animais, garantindo que o consumo desses novos alimentos seja tão seguro quanto o de seus análogos obtidos por técnicas convencionais. Contudo, muitas vezes o termo “segurança alimentar” (“food security”, em inglês) é utilizado equivocadamente no mesmo sentido de “biossegurança alimentar”. Primariamente, a expressão “segurança alimentar” trata do acesso aos alimentos e abrange todo o conjunto de necessidades para a obtenção de uma nutrição adequada. Assim, para evitar qualquer erro de interpretação, o termo “biossegurança

alimentar” será utilizado ao longo deste trabalho para se referir à segurança de consumo de AGM e seus derivados.

A biossegurança no Brasil possui duas vertentes, que são a legal e a praticada. A biossegurança legal trata das questões envolvendo a manipulação e comercialização de OGM e seus derivados e de pesquisas com células-tronco embrionárias, e que estão reunidas na lei Nº 11.105, chamada de Lei de Biossegurança, sancionada pelo governo brasileiro em 24 de março de 2005, regulamentada pelo Decreto Nº 5.591, de 22 de novembro de 2005. Por sua vez, a biossegurança praticada é aquela desenvolvida em laboratórios, e, principalmente, nas instituições de saúde, e que envolve riscos por agentes químicos, físicos, biológicos, ergonômicos e psicossociais, presentes nesses ambientes. Impactos ambientais também são tratados à luz da biossegurança praticada (TEIXEIRA; VALLE, 2002; COSTA; COSTA, 2009; COSTA; COSTA, 2012).

No contexto da biossegurança legal, que é o que tange ao tema deste trabalho, a partir de 1960, cientistas norte-americanos iniciaram a discussão sobre a segurança das tecnologias derivadas de manipulações genéticas, pelo fato de que militares já demonstravam interesse na utilização dessas tecnologias para o aperfeiçoamento de armas biológicas (WRIGHT, 1994). Nesse cenário, a opinião pública começa a se preocupar com esses novos processos. Uma década depois, Van Rensselaer Potter (1911-2001), cientista e humanista norte-americano, criou o neologismo bioética (“bio”= vida, “ethos”= ética), e em janeiro de 1971, lançou o livro “Bioethica bridge to the future”, onde prega a necessidade de se conhecer as formas corretas do uso do conhecimento, em prol da sobrevivência do homem e da sua qualidade de vida. Já em 1975, aconteceu a reunião de Asilomar, cidade na Califórnia, EUA, que reuniu 138 personalidades da Ciência para discutirem os impactos da engenharia genética na sociedade. O documento final da reunião ficou pronto em 1976. Chegou-se ao consenso de que as pesquisas no campo da engenharia genética deveriam continuar em razão das amplas possibilidades da sua aplicação, porém deveriam ser buscados mecanismos para se estabelecer barreiras físicas e biológicas de segurança para pesquisadores envolvidos e o ambiente externo (COSTA; COSTA, 2012).

No Brasil, a primeira Lei de Biossegurança (Nº 9874) foi promulgada em 5 de janeiro de 1995, pelo então presidente Fernando Henrique Cardoso, e revogada em 24 de março de 2005. Atualmente, a Biossegurança Legal pode ser entendida como as ações de preservação da saúde humana, animal e ambiental, praticadas em ambientes onde estão presentes organismos geneticamente modificados – OGM, e/ou pesquisas envolvendo células-tronco embrionárias, de acordo com a Lei Nº 11.105 de 24 de março de 2005, como

mencionado anteriormente (COSTA; COSTA, 2009). Essa mesma lei instituiu a criação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), integrante do Ministério da Ciência e Tecnologia, que é uma instância colegiada multidisciplinar, de caráter consultivo e deliberativo, para prestar apoio técnico e de assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança (PNB) de OGM e seus derivados, bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e de pareceres técnicos referentes à autorização para atividades que envolvam pesquisa e uso comercial de OGM e seus derivados, com base na avaliação de risco fitossanitário, à saúde humana e ao meio ambiente. A CTNBio é responsável por acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico e científico nas áreas de biossegurança, biotecnologia, bioética e afins, com o objetivo de aumentar sua capacitação para a proteção da saúde humana, dos animais e das plantas e do meio ambiente (COSTA; COSTA, 2012; CTNBio, 2012).

A Lei de Biossegurança, bem como toda a legislação correlata para realização de quaisquer atividades com OGM e seus derivados estão disponíveis no website da CTNBio (<http://www.ctnbio.gov.br>), na seção “Legislações”. Já as normas que dizem respeito à avaliação de biossegurança alimentar de OGM e seus derivados serão apresentadas adiante no item 10.

8 Biossegurança alimentar de plantas GM e seus derivados

Na longa história de produção de novas variedades de plantas de interesse agrícola através do melhoramento vegetal convencional, raramente cultivares melhorados tiveram que ser retiradas do mercado devido a questões relacionadas ao risco que poderiam oferecer à saúde humana e/ou animal. De fato, melhoristas vegetais já introduziram no mercado milhares de novas variedades de plantas, tendo sido relatados poucos ou, mesmo, nenhum efeito negativo decorrente do consumo das mesmas (ATHERTON, 2002). Na verdade, poucos alimentos convencionais (não GM) hoje consumidos foram submetidos a quaisquer testes toxicológicos (TOMLINSON, 2000; CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Mesmo assim, esses alimentos são geralmente aceitos como seguros (TOMLINSON, 2000). De acordo com a OECD (“Organization for Economic Cooperation and Development”), um alimento é considerado seguro se existir certeza razoável de que nenhum dano resultará de seu consumo, em condições previstas de uso (WHO, 2000). Contudo, muitos dos alimentos convencionais hoje existentes, provavelmente, apresentariam efeitos adversos se pudessem ser consumidos em doses suficientemente altas (DONALDSON; MAY, 1999; CODEX ALIMENTARIUS,

2009). Ainda existem outros que são intrinsicamente perigosos, tais como mandioca, o peixe fugu (baiacu) e batatas germinadas. Além disso, qualquer alimento pode tornar-se perigoso quando contaminado com toxinas, sejam elas de natureza química (e.g. arsênico), bioquímica (e.g. aflatoxina) ou biológica (e.g. *E. coli*) (MCHUGHEN, 2012).

Essa preocupação com a segurança do consumo de alimentos tradicionais surgiu desde que os melhoristas vegetais deixaram de depender exclusivamente dos métodos empíricos do melhoramento convencional para atingirem seus objetivos e passaram a utilizar a tecnologia do DNA recombinante para promover mudanças genéticas direcionadas. Assim, informação genética de quase qualquer forma de vida poderia ser introduzida em variedades agrícolas para obtenção de características desejadas (ATHERTON, 2002) e, ainda, num curto espaço de tempo quando comparada às técnicas convencionais. Os responsáveis pela comercialização da nova variedade utilizando técnicas de engenharia genética têm a responsabilidade de garantir que o alimento derivado desse cultivar transgênico é tão seguro e nutritivo quanto aquele obtido do seu equivalente convencional (ATHERTON, 2002). Por outro lado, novos cultivares obtidas através de radiação ionizante como agente mutagênico, que pode causar alterações genéticas substanciais e tornar o alimento potencialmente perigoso, são isentos de qualquer teste de segurança, seja como alimento para humanos e/ou animais ou para o meio ambiente. Neste caso, a modificação genética não é caracterizada ou, sequer, conhecida pelos melhoristas. Em muitos países, essas novas variedades devem apenas ser descritas como diferentes das demais, uniformes, que os indivíduos da população são semelhantes entre si e que a nova característica é passada através das gerações (MCHUGHEN, 2012).

Talvez a insegurança do público consumidor em relação ao consumo de produtos GM seja apenas um resultado da falta de consenso das autoridades regulamentadoras e cientistas sobre os métodos e procedimentos que devem ser adotados na avaliação de biossegurança de alimentos transgênicos. É bem estabelecido que existem dificuldades claras na aplicação dos testes toxicológicos clássicos para avaliação da segurança de consumo de alimentos tradicionais (OECD, 1996), especialmente no que concerne ao uso de animais de laboratório para tal fim. Os alimentos, por sua vez, são misturas complexas de vários compostos, apresentando uma ampla variação na composição e valor nutricional. Devido ao volume e efeito de saciedade, os alimentos são usualmente fornecidos a animais em quantidades bem abaixo daquelas que provavelmente estariam presentes em uma dieta humana, o que reduz os fatores de segurança. Deve ser levado em consideração, ainda, o valor nutricional do alimento e, conseqüentemente, o balanceamento das dietas utilizadas. Por outro

lado, o uso de animais de laboratório é parte fundamental dos estudos toxicológicos de avaliação de segurança de produtos químicos. Neste caso, a substância teste é bem caracterizada, de pureza conhecida, sem valor nutricional e a exposição de humanos à mesma é geralmente baixa (DONALDSON; MAY, 1999; ATHERTON, 2002; CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Como consequência, a detecção de quaisquer efeitos adversos potenciais e o relacionamento destes a uma característica individual do alimento pode ser extremamente difícil (DONALDSON; MAY, 1999; WHO, 2000; CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Assim, as dificuldades para a aplicação de testes toxicológicos tradicionais e procedimentos de avaliação de risco a alimentos fizeram com que uma abordagem alternativa fosse requerida para a avaliação de segurança de alimentos GM, o que levou ao desenvolvimento do conceito de equivalência substancial (WHO, 2000).

Inicialmente, o conceito de equivalência substancial foi proposto pela OECD, em 1993, mas tem sofrido modificações ao longo dos anos. O conceito de equivalência substancial não é uma avaliação de segurança tradicional por si só, mas um exercício dinâmico e analítico de avaliação de segurança comparativa entre um novo alimento ou ingrediente alimentar, neste caso um OGM ou derivado de OGM, e um alimento ou ingrediente alimentar já existente (WHO, 1995). Através de análises apropriadas, o novo alimento GM é comparado quanto as suas características fenotípicas, composicionais (químicas e bioquímicas) e nutricionais ao seu equivalente convencional que, por sua vez, deve possuir um longo histórico de uso seguro (MAYERS *et al.*, 2002; CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Assim, a aplicação desse conceito é muito dependente da escolha adequada do equivalente convencional para fins comparativos. Isso é tido como um dos principais entraves para utilização do conceito de equivalência substancial. Além disso, para estabelecer uma comparação abrangente entre o alimento convencional e o transgênico é preciso que se tenham grandes bases de dados nutricionais, o que muitas vezes não é disponível em países em desenvolvimento (MAYERS *et al.*, 2002). Apesar de tudo, essa abordagem não se destina à verificação da segurança absoluta do novo alimento GM, o que seria algo inalcançável para qualquer alimento. O objetivo primordial é garantir que o alimento e os componentes nele introduzidos por modificação genética sejam tão seguros quanto seus análogos convencionais (WHO, 2000). O conceito de equivalência substancial é praticamente utilizado apenas na avaliação de plantas GM, mas poderia ser facilmente estendido para outros OGM ou organismos modificados por outras biotécnicas ou melhoramento convencional dada a sua flexibilidade conceitual (PEDERSEN, 2000; MAYERS *et al.*, 2002; WATANABE; NUTTI, 2002; CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

Apesar das críticas e das dificuldades para se chegar a um consenso, o conceito de equivalência substancial foi aplicado com sucesso para avaliação de muitas variedades de plantas GM de primeira geração em vários países (MAYERS *et al.*, 2002) e, ainda, hoje é a base da avaliação de biossegurança alimentar de alimentos derivados de plantas DNA-recombinantes definida pelo Codex Alimentarius (2009). Contudo, especula-se que para a avaliação das próximas gerações de plantas GM o conceito de equivalência substancial não seja mais apropriado devido à complexidade das modificações genéticas introduzidas (MAYERS *et al.*, 2002).

Quando se planeja o desenvolvimento de uma planta transgênica, com a inserção do gene exógeno e a consequente expressão da característica desejada, tem-se que esse é o efeito intencional da modificação genética realizada e, portanto, espera-se que seja também a única diferença entre a nova variedade transgênica e a sua equivalente convencional. No entanto, efeitos não-intencionais podem ocorrer devido à inserção aleatória de sequências de DNA no genoma da planta, o que pode causar uma ruptura ou silenciamento de genes existentes, ativação de genes silenciosos ou modificações na expressão dos mesmos. Efeitos não-intencionais podem também resultar na formação de padrões novos ou alterados de metabólitos, tais como a expressão de enzimas em níveis elevados que podem dar origem a efeitos bioquímicos secundários, mudanças na regulação de vias metabólicas e/ou alterações nos níveis de metabólitos. Assim, a avaliação da biossegurança de alimentos derivados de plantas de DNA-recombinantes envolve métodos para identificar e detectar esses efeitos indesejados e procedimentos para avaliar sua relevância biológica e potencial de impacto na segurança do consumo desses alimentos. Uma variedade de dados e informações são necessários a fim de avaliar os efeitos indesejáveis, mesmo porque, nenhum teste individual pode detectar todos os possíveis efeitos não-intencionais ou identificar, com certeza, aqueles relevantes para a saúde humana (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Desde já, fica claro que a avaliação da biossegurança alimentar de plantas transgênicas e seus derivados é uma ação integrativa e dinâmica, em que informações são coletadas, ao mesmo tempo, que várias atividades são realizadas para provar a equivalência substancial entre o transgênico e o análogo convencional. A partir disso, é possível ou não avaliar a presença de efeitos não-intencionais e ditar a necessidade de testes posteriores.

Para o estabelecimento de conceitos e princípios gerais para a avaliação de biossegurança alimentar de OGM e seus derivados, um grande esforço tem sido feito por parte tanto de organizações governamentais e sem fins lucrativos quanto da iniciativa privada. No entanto, a OECD, a FAO e a OMS têm liderado as pesquisas para delineamento das práticas a

serem adotadas para avaliação de segurança do consumo de transgênicos a partir do estabelecimento de comitês integrados por especialistas de todo o mundo, com reuniões frequentes dos mesmos para revisão de protocolos e definição de novos conceitos e métodos.

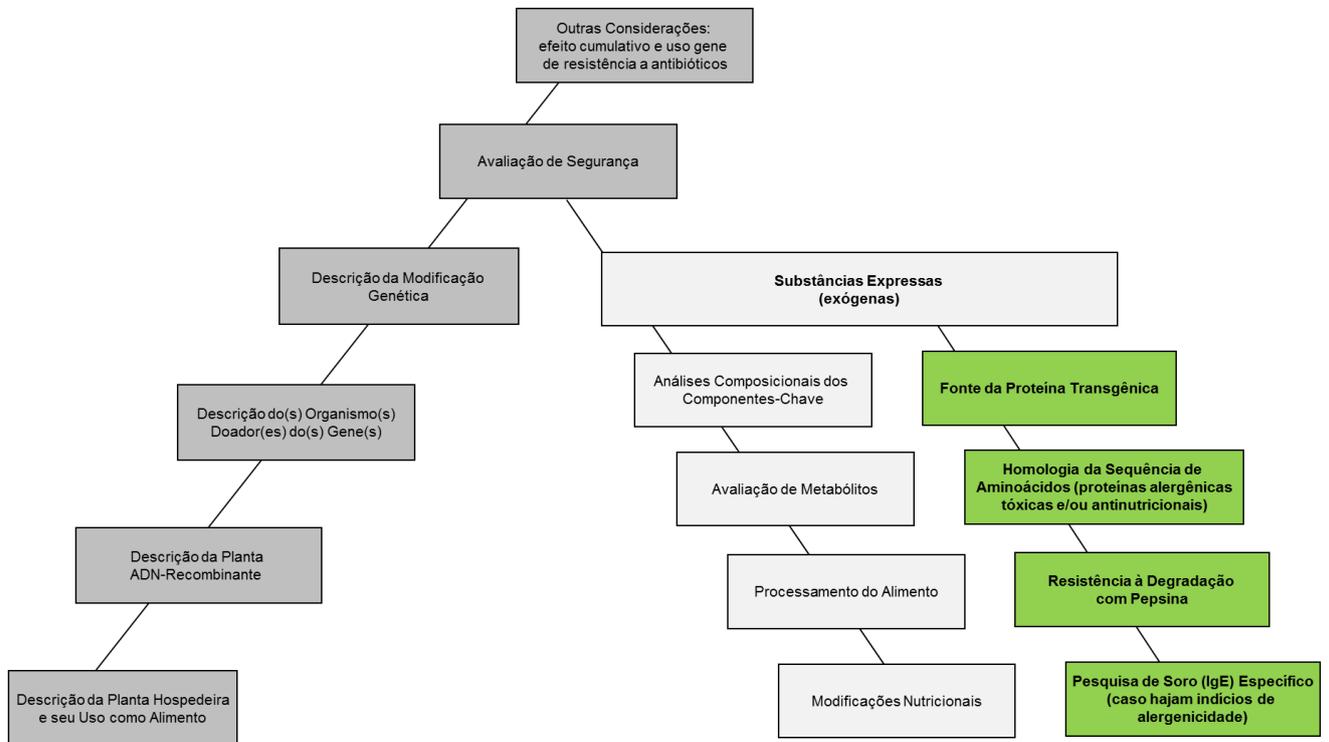
O Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentares, tem como objetivos básicos proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas equitativas no comércio internacional de alimentos. A Comissão do Codex Alimentarius (CAC) estabeleceu a Força Tarefa Intergovernamental sobre Alimentos Derivados de Biotecnologia (FBT) com a finalidade de desenvolver padrões, normas ou recomendações para alimentos derivados de biotecnologia moderna ou características introduzidas em alimentos por meio desta tecnologia, com base em evidências científicas e análise de risco. Daí resultou a 1ª e a 2ª edição do Codex Alimentarius – Alimentos Derivados da Biotecnologia Moderna (*Foods Derived from Modern Biotechnology*), de 2003 e 2009, respectivamente, reunindo os métodos de avaliação de biossegurança alimentar que mais se aproximam do consenso entre os estudiosos. O Codex Alimentarius é adotado em muitos países membros da Organização Mundial do Comércio (OMC) para regulamentação da segurança de consumo de transgênicos.

Na Figura 1.3, estão mostradas todas as etapas para avaliação da biossegurança alimentar de produtos derivados de plantas DNA-recombinantes de acordo com as recomendações do Codex Alimentarius (2009). Como pode ser visualizado, é um estudo longo e laborioso que deve elencar um grande número de informações. Estas vão desde descrições sobre o cultivar parental da planta transgênica, passando por uma descrição da própria planta recombinante, da modificação genética e do(s) organismo(s) doador(es) do(s) gene(s), seguida da avaliação de segurança propriamente dita até outras considerações como o possível efeito cumulativo dos produtos gênicos e o uso de genes resistência a antibióticos. Dentro da avaliação de segurança está a análise de risco das substâncias expressas pelo(s) gene(s) exógeno(s) que é o alvo deste trabalho e será mais bem apresentada no item 9. Para exemplificar a aplicação desse sistema de avaliação pode-se consultar a página da CTNBio na Internet (<http://www.ctnbio.gov.br>), na seção de “Aprovações Comerciais” de plantas GM, onde podem ser acessados vários pareceres técnicos relatando todas as informações fornecidas pelo requerente da liberação comercial da variedade GM. Tais informações contemplam todas as etapas de avaliação sugeridas pela publicação da Comissão do Codex Alimentarius, uma vez que a legislação brasileira de biossegurança alimentar adota tais recomendações.

Apesar de este robusto sistema de avaliação de biossegurança alimentar de plantas DNA-recombinantes ser endossado por instituições como a OECD, FAO e a OMS e ser

adotado por muitos países em suas políticas públicas de biossegurança, existe um grande debate dentro da comunidade científica sobre a eficácia da abordagem e dos métodos empregados, bem como da idoneidade dos resultados fornecidos pelas empresas privadas, maiores responsáveis pelo desenvolvimento das variedades transgênicas disponíveis e pela execução dos testes de segurança. Mesmo buscando não se estender no que diz respeito a essas divergências, é importante citar alguns trabalhos científicos e seus respectivos autores a fim de se estabelecer uma perspectiva imparcial sobre os métodos de avaliação da biossegurança de transgênicos e, quem sabe, colaborar para a construção de um olhar crítico sobre a normalização, legislação e demais mecanismos regulatórios de OGM.

Figura 1.3 - Esquema mostrando todas as etapas para avaliação da biossegurança alimentar de produtos derivados de plantas DNA-recombinantes de acordo com as recomendações do Codex Alimentarius (2009). Em verde, as etapas para avaliação de risco dos produtos expressos pelos genes exógenos



Numa revisão recente, Domingo e Bordonaba (2011) relataram que, apesar do aumento nos últimos anos, o número de trabalhos sobre biossegurança alimentar de plantas GM é, ainda, muito limitado, bem como existem falhas claras na execução experimental de muitos deles. Outro ponto digno de nota, segundo os autores, é a interpretação equivocada do conceito de equivalência substancial, sendo, muitas vezes, tido como o ponto final da avaliação de segurança, o que na verdade deve ser o ponto inicial. Além disso, os autores ressaltaram que o número de trabalhos mostrando efeitos deletérios decorrentes da ingestão de plantas GM em animais já chega a ser equivalente àqueles que constataram a inocuidade desses alimentos. Por fim, é sugerida a revisão dos métodos e conceitos de avaliação de biossegurança alimentar de plantas GM, destacando-se a inserção dos ensaios de alimentação de longa duração (1 a 2 anos) com animais de laboratório e a realização de estudos epidemiológicos em populações que consomem transgênicos.

Outro grupo de pesquisa que tem se destacado nessa vertente é aquele liderado pelo Dr Gilles-Eric Séralini (Universidade de Caen, Caen, França). Em seus estudos, o referido grupo de pesquisa também reforça a necessidade de se incluírem na avaliação de biossegurança alimentar de OGM e seus derivados os experimentos de longa duração com animais de laboratório. Além disso, os mesmos pesquisadores apontam equívocos cometidos nas análises estatísticas e divergências nas interpretações biológicas de vários estudos de biossegurança alimentar publicados pelas próprias empresas desenvolvedoras dos OGM, dentre os quais, muitos já estão no mercado em vários países (SÉRALINI *et al.*, 2007; DE VENDÔMONIOS *et al.*, 2010). Recentemente, esse mesmo grupo publicou um estudo num jornal científico bastante conceituado, relatando os efeitos deletérios à saúde de ratos machos e fêmeas de dietas à base do milho transgênico NK603 tolerante ao herbicida glifosato (Monsanto Company, EUA), em diferentes tratamentos, bem como submetidos à ingestão de água contendo o próprio herbicida comercial (RoundupReady, Monsanto Company, EUA) (SÉRALINI *et al.*, 2012). Contudo, esse estudo tem recebido críticas severas da comunidade científica internacional, no que diz respeito ao desenho experimental, as análises estatísticas realizadas e ao estudo histopatológico realizado com os órgãos dos animais alimentados com o referido milho transgênico (GRUNEWALD; BURY, 2013; OLLIVIER, 2013; SCHORSCH *et al.*, 2013).

Portanto, as práticas e regulamentações no que concerne a biossegurança alimentar de plantas GM e seus derivados são ainda alvo de muita controvérsia, o que foge completamente do escopo deste trabalho. Assim, o presente estudo adotará os princípios e recomendações do Codex Alimentarius (CODEX ALIMENTARIUS, 2009) e da literatura

afim pelos motivos já expostos previamente, assumindo uma postura idônea e crítica dos fatos.

9 Biossegurança alimentar de proteínas recombinantes

Dentre os nutrientes de uma dieta, as proteínas são consideradas importantes por estarem envolvidas na síntese tecidual e em funções metabólicas específicas, sendo provenientes delas os aminoácidos necessários para a construção e manutenção dos tecidos orgânicos (SGARBIERI, 1996; MAHAN; SCOTT-STUMP, 1998). As proteínas são polímeros feitos a partir de 20 aminoácidos comuns conectados através de ligações peptídicas covalentes, em sequências específicas codificadas pelo DNA no genoma. A carga, a polaridade e a hidrofobicidade dos aminoácidos de qualquer proteína estão envolvidos diretamente na definição de sua estrutura tridimensional. O corpo humano pode produzir 11 dos 20 aminoácidos comuns a partir de precursores dietéticos. Os outros nove aminoácidos, que não podem ser sintetizados pelo organismo humano, são, por conseguinte, considerados “essenciais” e devem ser obtidos através da alimentação. Além disso, dois aminoácidos que são derivados de aminoácidos essenciais são considerados “condicionalmente essenciais” porque podem ser derivados metabolicamente partir de outros aminoácidos (isto é, tirosina, que é derivado de fenilalanina, e cisteína, que é derivado da metionina) (SMOLIN; GROSVENOR, 2000).

Como parte do metabolismo celular normal, as proteínas são constantemente sintetizadas e degradadas nos tecidos do corpo. Consta que o corpo humano sintetiza aproximadamente 300 g de proteína nova por dia (SMOLIN; GROSVENOR, 2000). Devido a isso, uma fonte constante de novos aminoácidos deve ser fornecida, sendo a alimentação a responsável por parte desse suprimento. Em mamíferos, a degradação de proteínas consumidas oralmente começa no estômago, onde o pH ácido fornece o ambiente adequado para as enzimas digestivas hidrolisarem as ligações peptídicas que unem os aminoácidos. Esse pH baixo do estômago, frequentemente conduz à perda da estrutura terciária e à desnaturação das proteínas ingeridas. Além disso, a pepsina, uma endopeptidase do estômago, contribui para a degradação das proteínas por meio da clivagem de um relativamente amplo espectro de ligações peptídicas. A degradação de proteínas alimentares continua no intestino delgado, onde as proteínas e fragmentos peptídicos são submetidos a uma extensa bateria de enzimas digestivas proteolíticas (tripsina, quimotripsina, dentre outras) (DELANEY *et al.*, 2008). Apesar desse sistema relativamente eficiente de degradação de proteínas, quantidades

pequenas das proteínas alimentares podem sobreviver intactas ao trato gastrointestinal (RATNER; UNTRACHT; COLLINS-WILLIAMS, 1952).

Enquanto a maioria das proteínas alimentares é inócua, um número relativamente pequeno de proteínas existentes na natureza é conhecido por exercer efeitos tóxicos quando ingeridas. Nesses casos, as proteínas são resistentes aos processos digestivos tão eficazes para a maioria das proteínas da alimentação. De todas as proteínas tóxicas conhecidas, as produzidas por bactérias são as mais bem caracterizadas (GILL, 1982). Dentre essas, pode-se citar aquelas produzidas por *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus* (SAKAGUCHI; OHISHI; KOZAKI, 1988) e as enterotoxinas pela linhagem de *Escherichia coli* O157:H7, pelo *Vibrio cholerae* e por *Clostridium perfringens* (POPOFF, 1998). Em comparação com o número já relatado de proteínas tóxicas de bactérias, a quantidade de toxinas ou antinutrientes proteicos produzidos por plantas e animais é consideravelmente menor. Dentre as proteínas tóxicas identificadas em plantas destacam-se proteínas antifúngicas e lectinas (CHEEKE; SHULL, 1985; LIENER, 1994; GATEHOUSE *et al.*, 1999). Também, inibidores de proteases (e.g., inibidores de tripsina e de quimotripsina) podem interferir com os processos normais de digestão das proteínas e, em níveis mais elevados, podem ser tóxicos. Além de proteínas tóxicas de plantas, alguns animais incluindo escorpiões e cobras produzem venenos que contêm toxinas proteicas, mas que tem pouca significância quando administradas por via não-oral (MAGALHÃES *et al.*, 1998; SIDELL *et al.*, 1997).

Outro ponto a se destacar sobre a natureza das proteínas alimentares é a presença de proteínas alergênicas. No geral, poucas proteínas alimentares são alergênicas, no entanto, todos os alérgenos alimentares conhecidos são proteínas. Por isso, quando se investiga os perigos potenciais da introdução de uma proteína inédita na alimentação humana e/ou animal deve dedicar-se bastante atenção ao potencial alergênico desses compostos. De fato, muitas das mesmas ferramentas utilizadas para avaliar a segurança de consumo de novas proteínas quanto ao seu potencial tóxico são aplicáveis à detecção do potencial alergênico (e.g., a história de uso seguro, bioinformática e análise de digestibilidade *in vitro*). Por isso, existe uma sobreposição clara quando se investiga o potencial tóxico e/ou antinutricional e alergênico de uma nova proteína recombinante. Em vista disso, um componente importante da avaliação da segurança de produtos agrícolas produzidos por meio da biotecnologia através da expressão de proteínas transgênicas é a avaliação de biossegurança alimentar das proteínas expressas. Isso decorre do fato de que muitas dessas proteínas recombinantes podem não ter sido componentes de alimentos previamente consumidos e, portanto, a segurança de consumo

dessas proteínas para os seres humanos e/ou animais pode não ser conhecida (DELANEY *et al.*, 2008).

Na Figura 1.3, estão apresentadas (em verde) as análises de risco a serem realizadas com proteínas transgênicas de acordo com o Codex Alimentarius (2009). Na verdade, essa abordagem funciona na forma de uma árvore de decisão que fornece decisões distintas de sim/não que conduzem a um próximo passo específico (METCALFE *et al.*, 2005). Além disso, é tido que nenhum ponto-final sozinho pode prever o potencial tóxico, antinutricional e/ou alergênico de uma nova proteína. Dessa forma, os seguintes fatores são considerados nessa abordagem: a fonte do gene; a similaridade da sequência de aminoácidos da proteína de interesse comparada àquela de proteínas tóxicas, antinutricionais e/ou alergênicas; a estabilidade da proteína à digestão com pepsina num ensaio de digestibilidade *in vitro*; e, quando necessário, pesquisa de anticorpo(s) (IgE) anti-proteína teste em bancos de soros humanos e/ou testes com modelos animais (CODEX ALIMENTARIUS, 2009; GOODMAN *et al.*, 2005).

Neste contexto, Delaney *et al.* (2008) propuseram uma abordagem em duas etapas baseada em pesos de evidência para avaliar a segurança de proteínas transgênicas ao invés da árvore de decisão utilizada até então. Trata-se de uma forma mais flexível de abordagem e que leva em conta a totalidade dos dados de uma forma holística. Idealmente, o valor preditivo de cada parte da evidência deve ser bem compreendido, a fim de dar a certos dados mais "peso" do que a outros durante a avaliação, conduzindo assim a uma maior confiança na avaliação global (FIGURA 1.4). A Etapa 1 (*Tier I*) (identificação de perigos potenciais) inclui uma avaliação da função biológica ou modo de ação e a aplicação a qual se destina a proteína; avaliação do histórico de uso seguro (HOSU) da proteína em estudo (CONSTABLE *et al.*, 2007); comparação da sequência de aminoácidos da proteína com outras proteínas reconhecidamente tóxicas, antinutricionais e/ou alergênicas; e, uma avaliação de propriedades físicas da proteína transgênica (e.g., resistência ou sensibilidade a enzimas digestivas, à temperatura elevada etc). O conjunto dos componentes dessa primeira etapa fornece uma avaliação abrangente que, em muitos casos, permite a determinação precoce se a candidata à nova proteína ("Candidate Novel Protein - CNP") apresenta algum perigo potencial, apesar da forma de como conferir peso a cada componente individual ainda esteja evoluindo.

Preocupações levantadas por um ou mais dos componentes da Etapa 1 podem conduzir à avaliação de biossegurança a considerar a Etapa 2 (*Tier II*). Estudos indicados na Etapa 2 (caracterização do perigo) são realizados quando os resultados da primeira não são suficientes para determinar a segurança da proteína (certeza razoável de nenhum dano), sendo

realizados, portanto, novos testes numa abordagem caso-a-caso. Normalmente, esses estudos incluem ensaios de toxicidade aguda ou em doses-repetidas (28 dias) via oral, geralmente utilizando camundongos por exigirem uma menor quantidade de proteína nos testes. No caso de proteínas incorporadas a plantas para conferir proteção (“Plant-Incorporated Protectants”), estudos de toxicidade aguda são recomendados e, conseqüentemente, ditarão a necessidade de outros ensaios toxicológicos ou de alergenicidade. Além disso, outros testes *in vitro* e *in vivo* baseados em hipóteses podem ser considerados se informações relacionadas ao modo de ação, às análises de bioinformática ou aos testes de estabilidade às enzimas digestivas levantarem alguma preocupação (DELANEY *et al.*, 2008).

Para testar a eficácia da abordagem de duas etapas baseada em pesos de evidência, Delaney *et al.* (2008) avaliaram a biossegurança alimentar de seis proteínas recombinantes previamente analisadas por outros métodos, sendo elas: a proteína da capa do vírus Y da batata; a proteína PAT (fosfotricina acetiltransferase); a proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase); a proteína de *Bt* Cry1Ab; a proteína PMI (abreviatura de fosfomanose isomerase na língua inglesa); e, proteínas antifúngicas. Os autores concluíram que a abordagem proposta foi eficiente em atestar a segurança das referidas proteínas de modo que maior peso foi atribuído às etapas consecutivamente, conduzindo a um maior grau de confiança na avaliação de segurança global.

Figura 1.4 - Abordagem em duas etapas baseada em pesos de evidência para avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes. Adaptado de Delaney *et al.* (2008)

Etapa 1: Identificação de Perigo Potencial

- **História de Uso Seguro:** A proteína-alvo, ou uma estruturalmente ou funcionalmente relacionada, tem uma história de uso/consumo em alimentos e a fonte do ADN inserido não levanta qualquer preocupação toxicológica
- **Análises de Bioinformática:** A proteína não mostra similaridade significativa de sua sequência de aminoácidos primária com proteínas reconhecidamente tóxicas, antinutricionais ou alergênicas
- **Modo de Ação e Especificidade:** A proteína atua como intencionado e com um espectro de atividade conhecido
- **Digestibilidade *In Vitro* e Labilidade:** A proteína é rapidamente degradada/desnaturada por enzimas digestivas, pH e/ou temperatura
- **Nível de Expressão e Ingestão Dietética:** Níveis de expressão proteica na cultura alimentar ou nos produtos derivados estão determinados tal qual a exposição dietética pode ser estimada

Etapa 2: Caracterização do Perigo

Determinada numa abordagem caso-a-caso e pode incluir um ou mais dos seguintes testes:

- Avaliação de toxicidade aguda da proteína transgênica
- Avaliação de toxicidade doses-repetidas (28 dias) da proteína transgênica
- Outros estudos baseados em hipóteses

10 Aspectos legais da avaliação de biossegurança alimentar de OGM e seus derivados no Brasil

Como dito anteriormente, a Lei de Biossegurança (Nº 11.105. de 24 de março de 2005) é o alicerce legal da PNB de OGM e seus derivados, como destacado no Art. 1º, do Capítulo I, como se segue:

“Esta Lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, tendo como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente.”

Portanto, o Art. 1º aborda o escopo da Lei de Biossegurança, onde estão inseridas às normas e mecanismos de fiscalização para comercialização e consumo de OGM e seus derivados. Outro ponto que merece atenção nesse artigo é a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente. O Princípio da Precaução foi proposto formalmente na Conferência RIO 92 (GOLDIM, 2002). A sua definição, dada em 14 de junho de 1992, foi a seguinte:

“O Princípio da Precaução é a garantia contra os riscos potenciais que, de acordo com o estado atual do conhecimento, não podem ser ainda identificados. Este princípio afirma que a ausência da certeza científica formal, a existência de um risco de um dano sério ou irreversível requer a implementação de medidas que possam prever este dano.”

A Lei de Biossegurança traz também uma série de definições de termos-chave da área no Art. 3º, Capítulo I. Dentre eles, está a definição de derivado de OGM, como se segue:

“VI – derivado de OGM: produto obtido de OGM e que não possua capacidade autônoma de replicação ou que não contenha forma viável de OGM.”

De acordo com essa definição é possível inferir que os produtos de expressão do gene exógeno (e.g., as proteínas recombinantes) no OGM em questão são, por sua vez,

derivados de OGM. Essa afirmação é reforçada no parágrafo 2º, do Art. 3º, como mostrado abaixo:

“Não se inclui na categoria de derivado de OGM a substância pura, quimicamente definida, obtida por meio de processos biológicos e que não contenha OGM, proteína heteróloga ou ADN recombinante.”

Assim, proteínas recombinantes serão designadas como derivados de OGM no decorrer deste trabalho, sendo, portanto, todas as atividades realizadas com essas moléculas regidas pela atual Lei de Biossegurança, incluindo aquelas de avaliação de risco para o consumo humano e animal.

Ainda no Art. 14º da mesma lei, é possível conhecer todas as competências da CTNBio, estando dentre elas a emissão de decisão técnica, caso a caso, sobre a biossegurança de OGM e seus derivados no âmbito das atividades de pesquisa e de uso comercial de OGM e seus derivados, inclusive a classificação quanto ao grau de risco e nível de biossegurança exigido, bem como medidas de segurança exigidas e restrições ao uso (inciso XII). No parágrafo 4º, do mesmo artigo, está descrito o formato do parecer técnico público a ser emitido pela CTNBio, quando solicitada, por exemplo, a liberação comercial de uma nova cultivar GM. Parágrafo 4º, do Art. 14º:

“A decisão técnica da CTNBio deverá conter resumo de sua fundamentação técnica, explicitar as medidas de segurança e restrições ao uso do OGM e seus derivados e considerar as particularidades das diferentes regiões do País, com o objetivo de orientar e subsidiar os órgãos e entidades de registro e fiscalização, referidos no art. 16 desta Lei, no exercício de suas atribuições.”

Outros pontos interessantes que dizem respeito ainda às competências da CTNBio de acordo com a Lei de Biossegurança (Art. 14º) estão mostrados abaixo:

“XXI – reavaliar suas decisões técnicas por solicitação de seus membros ou por recurso dos órgãos e entidades de registro e fiscalização, fundamentado em fatos ou conhecimentos científicos novos, que sejam relevantes quanto à biossegurança do OGM ou derivado, na forma desta Lei e seu regulamento;
XXII – propor a realização de pesquisas e estudos científicos no campo da biossegurança de OGM e seus derivados;”

O inciso XXI deixa claro o caráter não-definitivo dos pareceres técnicos emitidos pela CTNBio e da ciência da possibilidade de avanços científicos nos métodos de avaliação de biossegurança alimentar de OGM e seus derivados. Já o inciso XXII evidencia o papel central da CTNBio como agente promotor do desenvolvimento, da estruturação e da

capacitação de toda a rede de pesquisa científica e de informação que envolve a temática de biossegurança de OGM e seus derivados. No entanto, o número de grupos de pesquisa que estão cadastrados no Diretório de Grupos de Pesquisa do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) como atuantes na área de Biossegurança Alimentar de OGM e seus derivados é muito restrito.

Quanto às atividades que devem ser realizadas na avaliação de risco de OGM ou seu(s) derivados(s), deve-se consultar a Resolução Normativa Nº 5, de 12 de março de 2008 que dispõe sobre as normas para liberação de OGM e seus derivados, por exemplo, para fins comerciais. Essa Resolução Normativa foi criada em observância às disposições contidas no inciso II do art. 14 da Lei n.º 11.105, de 24 de março de 2005. O Art. 1º, do Capítulo 1, da Resolução Nº 5, de 12 de março de 2008, diz que:

“A liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados - OGM e seus derivados obedecerá às normas constantes desta Resolução Normativa, bem como à autorização por escrito da CTNBio, de conformidade com todas as condições impostas na referida autorização.”

Nos Anexos I, II, III e IV, da Resolução Normativa Nº 5, de 24 de março de 2005, estão descritas todas as informações que deve conter um pedido de liberação comercial de um OGM ou derivado de OGM à CTNBio. Contudo, no que concerne à biossegurança alimentar, maior atenção deve ser destinada às informações solicitadas no Anexo II - Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal. Esse é ainda subdividido em categorias de acordo com a finalidade do OGM. A categoria que compete a este trabalho é a seguinte: “(A) Organismos consumidos como alimento”. Os itens dessa categoria que reportam a informações pertinentes a biossegurança alimentar dos produtos de expressão do(s) gene(s) exógeno(s) do OGM estão mostrados abaixo:

- “1. o histórico de uso na alimentação, no Brasil e em outros países do organismo parental ou doador, indicando o nível de consumo, o processamento anterior ao consumo e as espécies animais que se alimentam destes organismos;
5. a estabilidade à digestão e ao processamento industrial da proteína especificada pelo transgene com base nas propriedades físico-químicas;
9. as avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas em animais experimentais, descrevendo os resultados;
10. a similaridade dos produtos de expressão do OGM com alérgenos conhecidos, relatando possíveis reações alérgicas identificadas após

ingestão do OGM nas avaliações em animais experimentais, descrevendo os resultados.”

Assim, as informações solicitadas na avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes refletem a adoção pela CTNBio das recomendações dadas pelo Codex Alimentarius (2009) para Avaliação da Biossegurança Alimentar de Alimentos Derivados de Plantas DNA-Recombinantes, como mostrado no item 9 desta revisão de literatura. Dessa forma, a avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes de acordo com o teste de duas etapas baseado em pesos de evidência (Delaney *et al.*, 2008) e que será adotado neste estudo, também atende às exigências legais brasileiras para atestar a segurança de consumo da proteína mutante Cry8Ka5, uma vez que há uma sobreposição clara entre as atividades propostas.

Capítulo 2

Avaliação de Biossegurança Alimentar da Entomotoxina Mutante Cry8Ka5 através do Método de Duas Etapas baseado em Pesos de Evidência



1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA/JUSTIFICATIVA

No final da década de 1980, foi demonstrado que plantas GM de tabaco e tomate expressando genes *cry* de *Bt* eram mais resistentes ao ataque de insetos-praga do que as plantas parentais. No mesmo período, o desenvolvimento do milho *Bt* forneceu o primeiro exemplo de “commodity” resistente ao ataque de pragas (BARTON; WHITELEY; YANG, 1987; FISCHHOFF *et al.*, 2007; VAECK *et al.*, 1987). Posteriormente, plantas de batata, de algodão e de outras culturas menos importantes expressando genes *Bt* foram também rapidamente desenvolvidas e adotadas por produtores rurais em vários países. Em 2011, a área global plantada com transgênicos chegou a 160 milhões de ha., dos quais 23,9 milhões ha. foram cultivados com variedades resistentes ao ataque de insetos (JAMES, 2011). Segundo vários autores, as plantas *Bt* trouxeram muitos benefícios aos produtores e ao meio ambiente, uma vez que se diminuiu acentuadamente o uso de inseticidas químicos nas lavouras (FERRÉ; VAN RIE, 2002; KUMAR; CHANDRA; PANDEY, 2008; BROOKES; BARFOOT, 2010).

O algodão *Bt* foi uma das primeiras plantas transgênicas a ser comercializada, tendo já sido plantados ca. 100 milhões de ha. desde 1996 (JAMES, 2011). No Brasil, a primeira variedade de algodão *Bt* foi liberada para comercialização em 2005 e, hoje, já é possível encontrar no mercado de sementes pelo menos 12 variedades de algodão resistentes a insetos. Todas essas variedades expressam a toxina Cry1Ac como única proteína inseticida ou combinada a Cry1F ou Cry2Ab2 em arranjos piramidizados (CTNBIO, 2012). Contudo, tais variedades de algodão são essencialmente ativas contra lepidópteros (OLIVEIRA *et al.*, 2011; CTNBIO, 2012), enquanto que a principal praga da cotonicultura brasileira é um coleóptero, o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*) (SILVIE; LEROY, 2001). Neste contexto, torna-se fundamental a busca por novas moléculas Cry ativas contra coleópteros em estirpes brasileiras de *Bt* para geração de novas variedades de algodão GM mais adequadas às necessidades dos cotonicultores locais (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A fim de se obter novas moléculas Cry com atividade melhorada, as técnicas de evolução molecular *in vitro* vêm sendo amplamente utilizadas visando sua aplicação, principalmente, no melhoramento de plantas (YUAN *et al.*, 2005). Utilizando a técnica de “DNA shuffling” aliada à seleção de proteínas por “Phage display”, Oliveira *et al.* (2011) geraram uma biblioteca combinatória de variantes do gene *cry8Ka1* isolado da estirpe brasileira S811 de *Bt* e selecionaram variantes com atividade melhorada contra *A. grandis* e *S. frugiperda*. Dentre as variantes mais efetivas, estava a proteína mutante Cry8Ka5 que se

mostrou ca. 3 vezes mais potente do que a proteína original (Cry8Ka1) contra *A. grandis*. Assim, a mutante Cry8Ka5 é uma CNP a ser incorporada em plantas de algodão para conferir proteção ao ataque do bicudo.

Um componente importante da avaliação da segurança de produtos agrícolas obtidos por meio da biotecnologia através da expressão de proteínas transgênicas é a avaliação de biossegurança alimentar das proteínas expressas. Apesar das proteínas Cry não se caracterizarem como componentes naturais de alimentos de humanos e animais, essas proteínas possuem um histórico de uso seguro favorável. Formulações *Bt* já são utilizadas durante décadas na agricultura para controle de pragas sem terem sido relatados efeitos adversos decorrentes de ingestão acidental desses produtos (DELANEY *et al.*, 2008). Da mesma forma, proteínas Cry, tais como a Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C e Cry1Ab/Ac, testadas isoladamente ou incorporadas em plantas, mostraram-se bastante seguras após passarem por baterias de testes *in silico*, *in vitro* e *in vivo* (DRYZGA *et al.*, 2007; ONOSE *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2010). Por outro lado, já foram relatados alguns efeitos adversos pontuais da proteína Cry1Ac, tais como elevada imunogenicidade e, ainda, capacidade de indução de mudanças eletrofisiológicas no intestino de camundongos (VÁSQUEZ-PADRÓN *et al.*, 1999, 2000a,b; MORENO-FIERROS *et al.*, 2000). No caso da proteína Cry8Ka5, apesar da elevada similaridade estrutural e do modo de ação entre as proteínas Cry de três domínios (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001, BRAVO *et al.*, 2007), mudanças na estrutura primária de proteínas podem acarretar em modificações na estrutura secundária que, por sua vez, podem interferir na digestibilidade e ter consequências sobre o potencial imunogênico e alergênico da nova proteína (XU *et al.*, 2009).

Neste contexto, a proteína Cry8Ka5 deve ser submetida a testes de biossegurança alimentar para garantir a segurança de sua expressão em plantas de algodão, uma vez que, além da comercialização da pluma do algodão, das suas sementes extrai-se óleo comestível e o subresíduo da extração do óleo, a torta do algodão, é uma importante fonte de proteína na ração de bovinos e ovinos (ARAÚJO *et al.*, 2003). Para tanto, o método de avaliação de biossegurança alimentar em duas etapas baseado em pesos de evidência proposto por Delaney *et al.* (2008) tem-se mostrado bastante adequado. A primeira etapa enfoca a “identificação de perigos em potencial” a partir da determinação do histórico de uso da proteína; da comparação da sequência primária de aminoácidos da proteína-teste com a de proteínas tóxicas, antinutricionais e/ou alergênicas em bancos de dados; do modo de ação e da especificidade; e da susceptibilidade à digestão *in vitro* e a tratamento térmico. Já a segunda etapa baseia-se num estudo caso-a-caso, mas para proteínas inseticidas recomenda-se que seja

feito o teste de toxicidade aguda via oral em camundongos. Na verdade, esses testes são os mesmos recomendados pelo Codex Alimentarius (2009) que é adotado pela CTNBio na avaliação de risco de OGM e seus derivados para humanos e animais, porém aplicados de forma gradativa.

O histórico de uso seguro das proteínas Cry para fins agrícolas, a eficácia de plantas *Bt* no controle de pragas aliadas à potencialidade da proteína mutante Cry8Ka5 para o desenvolvimento de um algodão transgênico resistente à principal praga da bicudo-do-algodoeiro forneceram os subsídios para elaboração da seguinte hipótese:

A proteína mutante Cry8Ka5 é segura para o consumo de humanos e animais de acordo com o método de avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes de duas etapas e, portanto, mostra-se segura para transformação de algodão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a biossegurança alimentar da entomotoxina mutante Cry8Ka5 através do método de duas etapas baseado em pesos de evidência proposto por Delaney *et al.* (2008).

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso seguro do *Bt* e de suas proteínas Cry para diversos fins, evidenciando seu caráter inócuo no que diz respeito à biossegurança alimentar para humanos e animais;
- Realizar análises de bioinformática através de pesquisas em bancos de dados sobre a similaridade da sequência primária de aminoácidos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, utilizada como controle experimental, com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais já conhecidas;
- Pesquisar *in silico* a presença de sítios potenciais de N-glicosilação (comuns em proteínas alergênicas) na sequência primária de aminoácidos das proteínas estudadas;
- Especificar o modo de ação e o espectro de atividade da proteína Cry8Ka5 de acordo com a literatura científica especializada;

- Obter em larga escala as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, ca. 4,0 g de cada uma, a partir da expressão em sistema heterólogo (*Escherichia coli*), com alto índice de pureza (> 70%) e em condições específicas para cada proteína;
- Estimar a pureza das proteínas obtidas através de eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, com posterior escaneamento dos géis e cálculo da concentração relativa (%) das bandas proteicas de interesse através de “software” adequado;
- Verificar a identidade das proteínas produzidas a partir da determinação de sua sequência N-terminal;
- Determinar a digestibilidade *in vitro* e estabilidade à temperatura das proteínas em estudo, com posterior confirmação através de eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes;
- Realizar ensaio de toxicidade aguda via oral (dose única), na dose de 5.000 mg de proteína/Kg de peso corpóreo, da Cry8Ka5e da Cry1Ac, o controle proteico, em camundongos fêmeas (n = 5/grupo);
- Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos do soro dos animais provenientes do ensaio de toxicidade aguda;
- Determinar o peso úmido relativo e realizar análises histopatológicas dos órgãos dos animais provenientes do ensaio de toxicidade aguda;
- Avaliar a adequação do teste de duas etapas baseado em pesos de evidência para avaliação da biossegurança alimentar da proteína Cry8Ka5.

3 MATERIAIS

3.1 Reagentes Biológicos

3.1.1 Microrganismos

As linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) e JM109, foram adquiridas comercialmente da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) e da Promega (Fitchburg, WI, EUA) respectivamente.

3.1.2 Animais de Laboratório e alojamento

Quinze camundongos fêmeas convencionais, da linhagem Swiss, foram adquiridos do Biotério Central da UFC (Biocen-UFC) com três semanas de idade. Os animais foram alojados no Biotério Experimental do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), do Departamento de Biologia da UFC, com condições de temperatura ($23,0 \pm 2,0$ °C), fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) e umidade do ar (45-55%) controladas. Os camundongos foram mantidos em número adequado em caixas de polipropileno com substrato de raspa de pinho (Biotécnicas, São Paulo, Brasil) e água e ração (Biobase, Bio-Tec, São Paulo, Brasil) *ad libitum* até atingirem o peso aproximado de 20 g para realização dos testes.

Todos os protocolos com animais, adotados neste trabalho, foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, que adota os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e obedece a Lei N° 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) que regula o uso de animais em pesquisas científicas.

3.2 Reagentes químicos e outros materiais

3.2.1 Reagentes para expressão, purificação e quantificação das proteínas Cry

Ampicilina, isopropil-1-tiol- β -D-galactopiranosídeo (IPTG), lisozima, comassie brilliant blue G-250, albumina sérica bovina (BSA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA). A coluna de ácido nitrilotriacético-níquel foi comprada da QIAGEN (Venlo, Holanda), enquanto o imidazol e o ditiotretol (DTT) foram adquiridos da GE Healthcare (Uppsala, Suécia).

3.2.2 Reagentes para eletroforese

Acrilamida, Coomassie Brilliant Blue R-250, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), TEMED (*N*', *N*', *N*', *N*'- tetrametiletilenodiamina), trizma-base, metilenobisacrilamida, 2-mercaptoetanol e marcadores de massa molecular foram comprados da AMRESCO Inc. (Solon, OH, EUA). Marcador de massa molecular também foi adquirido da BenchMark Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)

3.2.3 Reagentes para sequenciamento e digestibilidade in vitro

Membranas de polifluoreto de vinilideno (PVDF), pepsina, pancreatina foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.3 Considerações sobre biossegurança

Todos os procedimentos executados neste trabalho com material oriundo da Tecnologia do DNA recombinante foram feitos em concordância com a Lei de Biossegurança (Lei Nº 11.105, de 24 de março de 2005) e sua legislação complementar. Além disso, os experimentos apresentados neste capítulo foram realizados em laboratórios com extensão de Nº de CQB (Controle de Qualidade em Biossegurança), certificado concedido pela CTNBio, sendo eles: o Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (Embrapa Cenargen, Brasília, DF), CQB Nº 004/96; o Laboratório de Toxinas Vegetais (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, CE) e o Bioprospec (Departamento de Biologia, UFC, Fortaleza, CE), ambos com extensão de CQB Nº 0102/99.

No geral, a maioria dos experimentos deste capítulo foi realizada no Bioprospec (UFC) e, portanto, serão descritos a seguir alguns procedimentos de biossegurança adotados no decorrer das atividades realizadas nesse espaço. As proteínas recombinantes foram armazenadas até uso em refrigerador/freezer exclusivo para esse fim, localizado na sala de experimentação animal do Bioprospec, de acordo com as normas da Instrução Normativa CTNBio No.17, de 17/11/1998. Todo o material oriundo da tecnologia do DNA recombinante foi manuseado e processado somente na sala de experimentação animal, assim como todos os experimentos com animais. Nos ensaios químicos foram utilizados pipetadores automáticos e EPIs (Equipamentos de Proteção Individual), tais como jaleco, luvas e máscaras. Todo o material biológico a ser descartado no final dos experimentos (fezes, restos de dieta e carcaça dos animais) foram armazenados em freezer (destinado somente para material a ser incinerado), localizado na mesma sala para serem encaminhados à incineração, seguindo as normas de transporte de OGM e derivados, da Instrução Normativa CTNBio No.4, de 19/12/1996. Os materiais não-biológicos a serem descartados (agulhas, seringas, máscaras, luvas etc) foram igualmente encaminhados para incineração. As agulhas e outros materiais perfurocortantes foram colocados em caixas de descarte apropriadas, antes de serem encaminhadas para incineração. Todas as salas possuem pias para lavagem das mãos,

próximas das saídas das respectivas salas. Próximo ao Bioprospec existe, ainda, um chuveiro de emergência e extintores de incêndio.

4 MÉTODOS

4.1 Levantamento do histórico de uso seguro da proteínas Cry de *Bt*

Um levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso seguro das proteínas Cry de *Bt* na sua forma isolada, como princípio ativo de formulações inseticidas ou como componente de alimentos transgênicos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Constable *et al.* (2007). Para guiar esta pesquisa sobre o histórico de uso seguro do *Bt* e de suas proteínas Cry tentou-se responder às seguintes perguntas: (1) por quanto tempo seres humanos ou animais já estiveram expostos; (2) a forma pela qual o alimento será processado ou preparado e seus prováveis níveis de ingestão; (3) o perigo potencial associado ao consumo; (4) os relatos de exposição animal e humana e suas consequências. Para tanto, foi acessada a base de dados de pesquisa na Internet, PubMed, da Biblioteca Nacional Americana de Medicina, parte do Instituto Nacional de Saúde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), que conta com mais de 22 milhões de citações. Para realizar a pesquisa foram utilizadas palavras-chave, em Língua Inglesa, combinadas de várias maneiras, como se segue: (a) “history of safe use” e “*Bacillus thuringiensis*”; (b) “history of safe use” e “Cry proteins”; (c) “food/feed safety” e “*Bacillus thuringiensis*”; (d) “food/feed safety” e “Cry proteins”; e, (e) “risk assessment” e “*Bacillus thuringiensis*”.

4.2 Análise de similaridade na sequência de aminoácidos da proteína Cry8Ka5 com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais

Foi realizada uma pesquisa *in silico* para avaliar o grau similaridade das sequências de aminoácidos da proteína Cry8Ka5 e da proteína controle Cry1Ac com aquelas de proteínas reconhecidamente alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais para humanos. Inicialmente, foi comparada a sequência de aminoácidos completa (alinhamento global) como sugerido por Delaney *et al.* (2008), sendo verificado, cuidadosamente, detalhes específicos do alinhamento [e.g., E-value < 0.01, identidade compartilhada > 20%, tamanho do alinhamento e frequência de espaços (“gap”) ≤ 6%] para determinar a significância de qualquer

similaridade encontrada, uma vez que não existe nenhum critério estabelecido para pesquisa de proteínas tóxicas e antinutricionais (HEROUEY-GUICHENEY *et al.*, 2009). Dessa forma, as sequências de aminoácidos completas da Cry8Ka5 e da Cry1Ac foram comparadas no formato sequência FASTA (PEARSON; LIPMAN, 1988) com sequências proteicas presentes em oito grandes bases de dados públicas de referência: NR, Refseq_Protein, SwissProt, Pat, APO e Env_nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); UniProt SwissProt (<http://www.uniprot.org/>); e, Uniprot-trEMBL (<http://www.expasy.org/>). O algoritmo utilizado para comparação foi BLASTP 2.2.27+ e a matriz de pontuação BLOSUM62.

Outra pesquisa foi feita para avaliar, especificamente, o potencial alergênico das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac. As sequências foram comparadas às sequências de alérgenos depositadas nos bancos de dados seguintes: (1) O “Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP)” da Universidade do Texas (“University of Texas Medical Branch”), nos EUA, (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/>); (2) O “Allergen Database for Food Safety (ADFS)” (<http://allergen.nihs.go.jp/>); (3) “AllergenOnline version 11 database” (<http://www.allergenonline.com/>); e, Allermatch™ da Universidade de Wageningen (Wageningen, Holanda), (<http://allermatch.org/>). SDAP contém 1425 sequências de alérgenos, enquanto o ADFS e o AllergenOnline possuem 1285 e 1491 sequências revisadas, respectivamente. As sequências de Cry8Ka5 e Cry1Ac foram submetidas a comparações do tipo FASTA completa (“Full FASTA”), usando como filtro (“cutoff”) E-value < 0.01, para detecção de identidade > 70% para a sequência completa, de similaridade > 35% em uma janela de 80 aminoácidos e de sequências de oito, sete ou seis aminoácidos contíguos idênticos àqueles de proteínas alergênicas conhecidas.

Para avaliar a relevância imunológica de peptídeos (8, 7 ou 6 aminoácidos) das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac encontrados nas pesquisas em bases de dados de alérgenos, os mesmos foram submetidos a uma nova pesquisa na base de dados de epítomos (determinantes imunogênicos) do ADFS, apresentada anteriormente.

4.2.1 Avaliação da presença de sítios de N-glicosilação na proteína Cry8Ka5

As sequências completas de aminoácidos de Cry8Ka5 e da proteína controle Cry1Ac foram analisadas quanto à presença de sítios de N-glicosilação através do programa NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) como sugerido por Xu *et al.* (2009).

4.3 Determinação do modo de ação e especificidade da proteína Cry8Ka5

De acordo com as indicações de Delaney *et al.* (2008), foi realizada uma pesquisa na literatura científica especializada para determinar o modo de ação e a especificidade das proteínas Cry de três domínios de *Bt*, analisando até que ponto é possível extrapolar essas informações para a proteína-teste, Cry8Ka5, com base no que já foi relatado para a mesma. Para tanto, foi acessada a base de dados de pesquisa PubMed na Internet (<http://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), utilizando palavras-chave em Língua Inglesa, combinadas de várias maneiras, como se segue: (1) “mode of action” e *Bacillus thuringiensis*; (2) “mode of action” e “*Bacillus thuringiensis*” e “specificity”; (3) “mode of action” e “Cry proteins”; (4) “mode of action” e “Cry proteins” e “specificity”; (5) “mode of action” e “Cry8 proteins”; e, (6) “mode of action” e “Cry8Ka5”.

4.4 Produção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac em sistema heterólogo (*E. coli*)

As etapas de expressão e purificação das entomotoxinas Cry8Ka5 e Cry1Ac foram todas realizadas no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I, situado na Embrapa Cenargen (Brasília, DF). Os protocolos de produção das referidas proteínas estão descritos a seguir.

4.4.1 Expressão e purificação da Cry8Ka5

A proteína Cry8Ka5 (massa molecular aproximada de 70 kDa) foi obtida a partir da expressão do gene *cry8Ka5* em *E. coli* BL21 (DE3), contendo o gene mutante inserido no plasmídeo pET101/D TOPO (Invitrogen), como descrito por Oliveira (2008). As células transformadas foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura, contendo ampicilina 100 µg/mL e incubadas durante 18 h, a 37 °C, sob agitação a 175 rpm. Posteriormente, este inóculo foi adicionado a 1000 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) líquido (NaCl 1%, extrato de levedura 0,5%, triptona 1%, pH 7,0), contendo ampicilina 100 µg/mL e, quando a absorbância 600 atingiu 0,8, a expressão foi induzida pela adição de 0,5 mM de IPTG, durante 6 h, a 37 °C, sob agitação a 175 rpm. Este cultivo foi centrifugado a 10.000 x g, por 10 min (Eppendorf, modelo 5810 R, Hamburgo, Alemanha), sendo o precipitado de células solubilizado em 25 mL de tampão de lise (tampão fosfato de sódio 50 mM, 300 mM NaCl, glicerol 10%, Triton X-100 0,5%, contendo 10 mg/mL de lisozima, pH 7,8) e incubado a 4

°C, durante 16 h. Após a incubação, as células foram lisadas por ultra-som em gelo (3 ciclos 60s a 70%). O produto da lise das células foi centrifugado a 12.500 x g, por 15 min, e o sobrenadante coletado foi analisado em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), como será descrito adiante. Posteriormente, o produto da expressão foi submetido à cromatografia de afinidade, utilizando-se 10 mL da resina Ni-NTA (“Nickel-Nitriloacetic Acid”). Para equilibrar a resina de níquel, foram utilizados 200 mL de solução de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 7,8). O produto da expressão foi injetado na coluna com fluxo de 1 mL/minuto, a 4 °C, segundo orientações do fabricante. Em seguida, foram adicionados à resina de níquel 200 mL de tampão de lavagem (tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM, 20 mM de imidazol, pH 7,8) em fluxo de 1 mL/minuto, para a eluição do material não-retido. Após a lavagem da resina, a proteína recombinante foi eluída com a adição de 100 mL de tampão de eluição (tampão fosfato de sódio 50 mM, de NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 7,8) em fluxo de 1 mL/minuto. A proteína eluída foi dialisada contra água destilada em membrana de diálise com poros de exclusão de 6-8 kDa (Fisherbrand, Pittsburgh, PA, EUA), durante 16 h, a 4 °C. Finalmente, as amostras foram liofilizadas e mantidas em local seco e arejado até o momento dos ensaios. As proteínas solúveis totais foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), bem como foram submetidas à análise em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970), para determinação de sua pureza e monitoramento da produção. Ambas as metodologias serão descritas a seguir.

4.4.2 Expressão e purificação da CryIAc

A protoxina CryIAc (massa molecular aproximada de 130 kDa) foi obtida por expressão heteróloga em *E. coli* JM109, transformada com o plasmídeo recombinante pKK, contendo o gene *cryIAc* de *Bt var. kurstaki* HD73 (dado não-publicado). As células foram crescidas em meio LB líquido, contendo ampicilina (1 µg/mL), a 37 °C, sob agitação a 175 rpm. Como indutor de expressão foi utilizado 1 mM de IPTG quando a absorbância 600 atingiu 0,8. Após 72 h de indução, as células foram coletadas por centrifugação (4.500 x g, por 20 min, a 10 °C) (Eppendorf, modelo 5810 R, Hamburgo, Alemanha) e o “pellet” foi ressuspenso em tampão de lise [sacarose 15%, lisozima 2 mg/mL, EDTA (“Ethylenediamine Tetraacetic Acid”) 50 mM, Tris – HCl 50mM, pH 8,0], por 12 h, a 4 °C. A suspensão foi sonicada em gelo (5 ciclos de 300s, a 70%) e centrifugada por 10.000 x g, por 15 min a 4 °C. O “pellet” foi então lavado por centrifugação (10.000 x g, por 30 min a 4 °C)

três vezes em 30 mL de solução de NaCl 0,5 M contendo Triton X-100 2%, cinco vezes em 30 mL de NaCl 0,5 M e duas vezes em 30 mL de água destilada. Em seguida, os corpos de inclusão contendo a protoxina Cry1Ac foram solubilizados em tampão de solubilização (DTT 10 mM, carbonato de sódio 50 mM, pH 10,5), por 2 h, a 37 °C, e dialisados contra água em membrana de diálise de 12 kDa. A protoxina foi ativada com tripsina 1:50 (m/m) a 37 °C, por 18 h. A proteólise foi parada com PMSF 1 mM. O material contendo a toxina Cry1Ac ativa foi novamente dialisado contra água em membrana de diálise de 12 kDa, por 24 h. A quantificação de proteínas solúveis foi feita através do método de Bradford (BRADFORD, 1976), bem como a produção, pureza e ativação da Cry1Ac (fragmento ativo com massa molecular aproximada de 70 kDa) foram monitoradas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), como descrito a seguir.

4.4.3 Quantificação de proteínas solúveis totais

A dosagem de proteínas totais solúveis foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A uma alíquota de 100 µL das amostras proteicas foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford (50 mL de metanol 95%, 100 mg de comassie brilliant blue G-250, 100mL de ácido fosfórico 85% e 900 mL de H₂O destilada). A mistura foi agitada e após 10 min foram feitas às leituras das absorvâncias a 595 em espectrofotômetro (Genesys 10, Spectronic Unicam, Nova Iorque, EUA). A concentração foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de albumina sérica bovina em NaCl 0,9%.

4.4.4 Análise das proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Para a análise da expressão, quantificação (pureza) e testes de estabilidade estrutural das proteínas, foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). No geral, todas as amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 com SDS 2%, glicerol, azul de bromofenol e 2-mercaptoetanol) de forma a conterem 10 µg de proteína. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100 °C, durante 10 min, e centrifugadas a 10.000 x g, durante 5 min, a 4 °C (Hettich, modelo Rotina 380 R, Kirchleugern, Alemanha). Em seguida, 20 µL de cada amostra foram aplicados em poços feitos em um gel vertical de 1 mm de espessura, composto por géis de aplicação e separação que encerravam 5% e 12,5% de acrilamida,

respectivamente. A corrida foi conduzida a uma corrente constante de 20 mA por placa, durante 1,5 h. As bandas proteicas foram coradas com solução de coomassie brilliant blue R-250 0,05%. A descoloração foi feita com solução de metanol, ácido acético glacial e água (1:3,5: 8, v/v/v, respectivamente). Como padrões de massa molecular foram utilizados vários oligonucleotídeos sintéticos da BenchMark Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

4.4.5 Determinação da pureza das amostras de proteínas de Cry8Ka5 e Cry1Ac

Para determinar a pureza das proteínas obtidas por expressão heteróloga em *E. coli* foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida, em condições desnaturantes, com amostras de Cry8Ka5 e Cry1Ac sob as condições descritas no item 4.4.4. A partir do perfil eletroforético foi possível determinar o percentual de cada proteína expressa em relação à presença de possíveis contaminantes na amostra total, após a realização das etapas de expressão e purificação. Para tanto, foi utilizado o software Image Master 2D platinum (v.7.0, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) que avalia o percentual relativo de *pixels* que as bandas correspondentes às proteínas-alvo ocupam no gel de poliacrilamida após varredura em equipamento adequado (GE Image Scanner III, GE, Uppsala, Suécia). Essa metodologia vem sendo adotada por nosso grupo com sucesso, mostrando-se adequada para calcular a pureza de amostras de proteínas obtidas por expressão heteróloga (dados não-publicados).

4.4.6 Determinação da sequência de aminoácidos N-terminal das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

Para determinar a identidade das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac produzidas procedeu-se a determinação de suas sequências N-terminais. Inicialmente, as proteínas foram corridas em géis de poliacrilamida (conforme descrito no item 4.4.4) e, em seguida, transferidas dos géis para membranas de PVDF em sistema de eletrocromia (“eletroblotting”). Para tanto, foi utilizado o equipamento TE 22 Mini Transfer Tank (Hoefer[®], Holliston, MA, EUA) e o tampão de transferência (192 mM de Glicina, 25 mM de Tris-Base, 20% de Metanol). A transferência ocorreu a 100 mA, com duração de 30 min. Em seguida, as membranas com as amostras de proteínas foram coradas com solução de coomassie brilliant blue R-250 0,05%. Em seguida, as bandas proteicas foram recortadas da membrana e colocadas em microtubo de 1,5 mL, onde foram descoradas com metanol puro. As bandas proteicas incrustradas nas membranas foram utilizadas para sequenciamento, utilizando-se um

sequenciador automático de proteínas (Shimadzu, modelo PPSQ-21/23, Kyoto, Japão). O processo químico empregado pelo sequenciador para determinar a sequência de aminoácidos foi derivada do método de degradação desenvolvido por Edman (1964). As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot disponível gratuitamente na Internet (<http://web.expasy.org/>), utilizando o programa FASTA3, ou com outras fontes apropriadas.

4.5 Determinação da digestibilidade *in vitro* e estabilidade à temperatura da proteína Cry8Ka5

4.5.1 Digestibilidade *in vitro*

A susceptibilidade à digestão *in vitro* das proteínas foi avaliada a partir da incubação da Cry8Ka5 e da Cry1Ac em fluido gástrico simulado (FGS) e em fluido intestinal simulado (FIS) na concentração 0,25 mg/mL, de forma não-sequencial. O FGS é uma mistura de NaCl 34 mM, HCl 0,7%, pH 1,0-2,0 e pepsina (Sigma P7012) 3,2 mg/mL, enquanto o FIS é composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5 e pancreatina (Sigma P7545) 10 mg/mL, ambos preparados de acordo com as recomendações de Roesler e Rao (2001). A mistura de cada proteína em FGS ou em FIS foi incubada a 37 °C, sob agitação constante, sendo retiradas alíquotas de 200 µL nos tempos de 0 s, 15 s, 30 s, 60 s, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min e 30 min. Os testes foram feitos, pelo menos, em duplicata para cada proteína nos diferentes fluidos. A digestibilidade das proteínas no FGS e no FIS foi monitorada por SDS-PAGE, como descrito no item 4.4.4.

4.5.2 Determinação de estabilidade à temperatura

A estabilidade das proteínas à temperatura foi avaliada a partir da incubação da proteína Cry8Ka5 e da Cry1Ac em 1,5 mL de solução tampão Tris-HCl 20 mM com EDTA 5 mM na concentração de 0,25 mg/mL. As proteínas foram submetidas à temperatura de 100 °C por períodos de 10, 30 e 60 min, sendo realizadas duplicatas para cada proteína e para cada tempo de exposição. O teste foi parado pela imersão dos tubos com as amostras em gelo e adicionando-se tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM, sacarose 8%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,02%). As amostras controle com 0 min de incubação da proteína (mantidas a 4 °C) também foram preparadas (HÉROUET *et al.*, 2005).

Após os tratamentos, as amostras foram analisadas quanto a sua integridade por SDS-PAGE, como descrito no item 4.4.4.

4.6 Ensaio de toxicidade aguda (dose única) via oral da proteína Cry8Ka5 em camundongos

O estudo de toxicidade aguda, em dose única, via oral da proteína Cry8Ka5 e da, proteína controle, Cry1Ac foi realizado de acordo com o protocolo teste limite N° 425 da OECD (2001). Foram utilizados camundongos fêmeas (n = 5/ por grupo) da linhagem Swiss com 5 semanas de idade e com peso variando de 18 a 22 g obtidos do Biocen-UFC. As proteínas foram ressuspensas em água destilada e administradas oralmente na dose de 5.000 mg/kg de peso corpóreo, por gavagem, para cada camundongo. Um grupo de camundongos administrados somente com o veículo, água destilada, também foi realizado. Todos os camundongos foram observados nas primeiras horas após a administração das proteínas e, depois, duas vezes ao dia durante 14 dias. A possível intervenção das proteínas sobre o comportamento natural dos camundongos foi observada, bem como indícios de toxicidade a partir da verificação dos seguintes sintomas/características: piloereção, anestesia, atividade motora, frêmito vocal, resposta ao toque, equilíbrio, presença de contorções, tremores, ptose e presença de fezes escuras ou disformes. O peso de todos os camundongos foi registrado nos dias 1, 3, 7, 10 e 14. No 14º dia, os animais foram levemente sedados com éter etílico e exsanguinados pela via do seio retro-orbital para determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos do soro. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para observação, monitorada por um patologista, da condição anatomo-morfológica de órgãos vitais, sendo, depois, pesados cuidadosamente para obtenção do peso úmido relativo. Por fim, os órgãos foram mergulhados em álcool etílico 70%, por 24 h, e, depois, transferidos para formalina 10% até a realização da rotina histológica.

4.6.1 Determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

Ao final do experimento de toxicidade aguda, os animais receberam uma leve anestesia por inalação de éter etílico e, posteriormente, o sangue foi coletado via plexo retro-orbital com auxílio de tubo capilar heparinizado. Uma parte do sangue foi coletada em tubos heparinizados para a determinação dos parâmetros hematológicos e outra parte foi coletada para obtenção de soro para dosagem de parâmetros bioquímicos. Para análise dos parâmetros

hematológicos foi utilizada uma alíquota 15 µL de sangue total de cada animal em um analisador hematológico veterinário (Sysmex, modelo pocH-100iV Diff, Kobe, Japão). Os parâmetros verificados foram: número de células brancas no sangue (leucócitos), número de células vermelhas do sangue (hemácias), concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (V.C.M.), hemoglobina corpuscular média (H.C.M.), concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.C.M.), número de plaquetas, % de linfócitos nas células brancas totais, % de neutrófilos, basófilos e monócitos, amplitude de distribuição das hemácias medida como coeficiente de variação (RDW-CV) e amplitude de distribuição das hemácias medida como desvio padrão (RDW-SD). Já para as amostras de soro dos animais foram analisados os parâmetros bioquímicos seguintes: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, uréia, proteína total, albumina, colesterol total, creatinina e triglicérides. As análises sorológicas foram feitas utilizando kits (Bioclin, QUIBASA, Belo Horizonte, Brasil) específicos para cada parâmetro, seguindo as instruções do fabricante.

4.6.2 Determinação do peso úmido relativo dos órgãos e análises histopatológicas

Ao final do experimento de toxicidade aguda, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os animais foram dissecados e cuidadosamente os órgãos/tecidos foram verificados quanto ao seu aspecto (cor, presença de manchas e/ou irregularidades anatômicas etc) por um histopatologista e, em seguida, pesados em balança de precisão (Bioprecisa, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil). Posteriormente, os órgãos foram fixados com álcool etílico 70%, por 24h, e depois, com formalina 10%. Os órgãos/tecidos dissecados foram: cérebro, timo, coração, pulmões, fígado, baço, pâncreas, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo, mas somente o duodeno prosseguiu para histopatologia), intestino grosso, rins, bexiga, útero, tuba uterina e ovários.

Todos os órgãos/tecidos fixados de acordo com o item anterior foram processados em várias etapas de desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes de 70 até 100%, diafanizados com xilol, para então serem embebidos e emblocados em parafina. Em seguida, foram feitos cortes em micrótomo com lâmina de diamante e, então, corados com hematoxilina e eosina. As lâminas de cada estrutura analisada no experimento foram examinadas por um histopatologista. Foram capturadas imagens das secções histológicas de todos os órgãos de, pelo menos, 1 animal/grupo experimental, utilizando um microscópio óptico (Leica, modelo DM1000, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera fotográfica

digital (Leica, modelo DFC295, Wetzlar, Alemanha) sob diferentes aumentos indicados nas barras de escala presentes nas fotografias.

4.6.3 Análise estatística dos dados do ensaio de toxicidade

As comparações estatísticas foram concebidas para determinar se as diferenças nas variáveis de resposta referidas acima (peso corporal, hematologia e parâmetros bioquímicos do soro e peso relativo de órgãos), entre grupos, foram atribuíveis à proteína Cry1C comparada aos grupos controle, Cry1Ac e Água, separadamente. A homogeneidade de variância foi analisada por meio da análise de variância simples (One-way ANOVA) com o “software” estatístico GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, EUA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Histórico de uso seguro

Na Tabela 2.1, estão sumarizados os principais aspectos positivos e negativos que compõem o histórico de uso de produtos à base de *Bt* e das proteínas Cry de acordo com a literatura científica. Assim, é notório que existe um grande número de relatos positivos associados ao uso de formulações inseticidas *Bt*, não tendo sido encontrada qualquer publicação relevante sobre efeitos adversos em humanos e animais não-alvo decorrentes de ingestão dessas substâncias. Da mesma forma, proteínas Cry de *Bt* estão presentes há mais de 15 anos em plantas GM e não foram relatados quaisquer efeitos deletérios decorrentes do consumo das mesmas.

5.2 Análises de bioinformática

As análises *in silico* das sequências de aminoácidos completas da proteína Cry8Ka5 e da proteína controle Cry1Ac revelaram a ausência de similaridade significativa, de acordo com os parâmetros estabelecidos com outras proteínas com propriedades tóxicas, antinutricionais e/ou alergênicas, depositadas em oito grandes bancos de dados de domínio público como mostrado na Tabela 2.2. A proteína Cry8Ka5 mostrou-se similar a outras proteínas Cry de *Bt* e a proteínas de *B. cereus* que, por sua vez, não são consideradas danosas

à saúde de humanos e animais e não apresentaram similaridade com proteínas tóxicas, antinutricionais e/ou alergênicas. Da mesma forma, a proteína Cry1Ac mostrou-se similar a várias outras Cry, bem como formas modificadas da própria Cry1Ac, e a proteínas de rotas metabólicas conservadas em vários reinos e que não se caracterizam como potencialmente perigosas.

Na Tabela 2.3 está sumarizada a pesquisa de similaridade da sequência primária de aminoácidos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac em quatro bancos de dados de proteínas alergênicas. A proteína Cry8Ka5 não apresentou identidade (> 70%) de sua sequência completa de aminoácidos com nenhuma proteína alergênica, bem como na pesquisa numa janela de 80 aminoácidos nenhum resultado de identidade maior que 35% com alérgenos foi detectado. Igualmente, na pesquisa de similaridade de 8 e 7 aminoácidos contíguos não foi encontrada nenhuma sequência idêntica, no banco de dados de alérgenos, àquela da Cry8Ka5, enquanto na pesquisa de 6 aminoácidos foi encontrado um resultado no ADFS, um no Allermatch™ e outro no SDAP, que não são necessariamente peptídeos diferentes. Para a sequência completa da proteína Cry1Ac também não foram encontradas proteínas alergênicas com mais de 70% de identidade entre as suas sequências, enquanto na pesquisa numa janela de 80 aminoácidos que é tida como mais relevante, nenhuma proteína com identidade superior a 35% foi detectada. Na pesquisa de 8, 7 ou 6 aminoácidos contíguos da sequência de Cry1Ac idênticos àqueles de proteínas alergênicas, apenas na pesquisa de 6 aminoácidos foram encontrados peptídeos iguais. O ADFS mostrou 16 resultados, enquanto o Allermatch™ e o SDAP apresentaram 12 e 10 resultados, respectivamente. Novamente, esses números não necessariamente correspondem a sequências diferentes.

A fim de avaliar a relevância imunológica dos peptídeos de 6 aminoácidos encontrados nas pesquisas em bases de dados de alérgenos, os mesmos foram submetidos a uma nova pesquisa na base de dados de epítomos (determinantes imunogênicos), ADFS, onde os resultados podem ser vistos na Tabela 2.4. Os três resultados encontrados na pesquisa de 6 aminoácidos contíguos para Cry8Ka5 correspondiam, na verdade, a duas sequências distintas de proteínas alergênicas, LGWLGL da proteína “Iso-Ara h3” do amendoim (*Arachis hypogaea*) e MTLTVL da proteína “Fel d 7 allergen” da saliva do gato doméstico (*Felis silvestres catus*). Contudo, ambos os peptídeos não estão presentes em nenhum epítomo, seja das próprias proteínas citadas ou de outras proteínas presentes no banco de dados. No caso dos resultados encontrados na pesquisa de 6 aminoácidos contíguos para sequência de Cry1Ac, de fato, eles correspondiam a apenas 8 sequências peptídicas distintas e de diferentes fontes de alérgenos. No entanto, apenas a sequência SNTVPA também presente na “Kappa-

casein” produzida pelo gado doméstico (*Bos taurus*) faz parte do epítipo alergênico dessa proteína.

Tabela 2.1 - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso de produtos à base de *Bt* e das proteínas Cry*

Substância	Aspectos positivos	Referências	Aspectos negativos	Referências
<i>Bacillus thuringiensis</i> (fonte do gene <i>cry8Ka</i>)	- Mais de 50 anos de uso de produtos <i>Bt</i> como inseticidas	Delaney et al. (2008)	- Formulações <i>Bt</i> contém proteínas Cyt (<i>Cytolytic proteins</i>) que apresentam atividade citolítica contra células de mamíferos	Kumar, Chandra e Pandey (2008)
	- Grande número de relatos científicos sobre a utilização segura dos pesticidas <i>Bt</i>	Kumar, Chandra e Pandey (2008); Sanahuja et al. (2011); Yu, Li e Wu (2011); Hammond e Koch (2012);		
	- Não existe nenhuma evidência que sugira que o <i>Bt</i> é perigoso para seres humanos e animais não-alvo	Sanahuja et al. (2011); Hammond e Koch (2012)		
	- Baixa atividade residual em condições ambientais	Frederici e Siegel (2008); Sanahuja et al. (2011)		
	- Não é considerado uma fonte de proteínas alergênicas			

Tabela 2.1 (CONTINUAÇÃO) - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso de produtos à base de *Bt* e das proteínas Cry*

Substância	Aspectos positivos	Referências	Aspectos negativos	Referências
Proteína Cry8Ka5 ou proteínas estruturalmente ou funcionalmente relacionadas	- Há mais de 15 anos são plantadas variedades de milho e algodão GM expressando proteínas Cry	Hammond e Koch (2012)	- Existem alguns relatos de efeitos imunogênicos das proteínas Cry1Ac e Cry1Ab	Moreno-Fierros et al., (2000); Vazquez-Padron et al. (2000); Finamore et al. (2008)
	- Não existem relatos de efeitos negativos decorrentes do consumo de plantas <i>Bt</i> em humanos e animais não-alvo	Hammond e Koch (2012)	- Mudanças na estrutura primária de proteínas podem interferir na digestibilidade e ter consequências sobre o potencial imunogênico e alergênico de uma nova proteína	Xu et al. (2009)
	- O cultivo de plantas <i>Bt</i> proporcionou a redução do uso de inseticidas químicos no campo	Kumar, Chandra e Pandey (2008); Brookes e Barfoot, (2010); Hammond e Koch (2012)		
	- Testes de segurança especialmente com roedores de laboratório têm uma tendência para inocuidade dessas proteínas para mamíferos	Drizga et al. (2007); Juberg et al. (2009); Xu et al., (2009); Cao et al., (2010); Guimarães et al., (2010); Liu et al. (2012)		

Tabela 2.1 (CONCLUSÃO) - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso de produtos à base de *Bt* e das proteínas Cry*

Substância	Aspectos positivos	Referências	Aspectos negativos	Referências
Proteína Cry8Ka5 ou proteínas estruturalmente ou funcionalmente relacionadas	- Proteínas Cry de três domínios compartilham grandes similaridades estruturais que estão diretamente relacionadas ao seu modo de ação e especificidade - Proteínas Cry8 atuam seletivamente em coleópteros, sendo já sido descritos receptores específicos no intestino médio de <i>A. grandis</i> para a Cry8Ka5	Sanahuja et al. (2011); Hammond e Koch (2012) Nakasu et al. (2010).		

*A abordagem utilizada baseou-se nas recomendações de Delaney *et al.* (2008) que, por sua vez, sobrepõe-se às recomendações do Codex Alimentarius (2009)

Tabela 2.2 - Pesquisa de similaridade da sequência primária completa das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac com proteínas tóxicas, antinutricionais e alergênicas em banco de dados gerais (não-especializados) de proteínas*

Banco de Dados	Cry8Ka5		Cry1Ac	
	Proteína(s) Similar(es)	Propriedade(s) da(s) Proteína(s) Similar(es)	Proteína(s) Similar(es)	Propriedade(s) da(s) Proteína(s) Similar(es)
NR [†]	Proteínas Cry de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)	Proteínas Cry de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)
Refseq_protein [†]	Proteínas Cry de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)	Proteínas de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)
	Proteínas de <i>B. cereus</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s); Similaridade com outras proteínas de <i>Bt</i>	Proteínas de <i>Bacillus cereus</i> Proteína do sistema de translocação de argininas geminadas	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s); Similaridade com outras proteínas de <i>Bt</i> Não-tóxica, antinutricional e/ou alergênica; Similaridade com <i>Bt</i>

Tabela 2.2 (CONTINUAÇÃO) - Pesquisa de similaridade da sequência primária completa das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac com proteínas tóxicas, antinutricionais e alergênicas em banco de dados gerais (não-especializados) de proteínas*

Banco de Dados	Cry8Ka5		Cry1Ac	
	Proteína(s) Similar(es)	Propriedade(s) da(s) Proteína(s) Similar(es)	Proteína(s) Similar(es)	Propriedade(s) da(s) Proteína(s) Similar(es)
Pat [†]	Proteínas Cry de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)	Proteínas de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)
PDB [†]	Proteínas Cry de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)	Proteínas de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)
			Fumarato redutase tipo Ii do complex respiratório, cadeia A de <i>Wolinella</i> <i>succinogenes</i>	Não-tóxica, antinutricional e/ou alergênica
Env_nr [†]	_#	-	-	-
UniProt SwissProt [‡]	Proteínas Cry de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)	Proteínas Cry de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)

Tabela 2.2 (CONCLUSÃO) - Pesquisa de similaridade da sequência primária completa das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac com proteínas tóxicas, antinutricionais e alergênicas em banco de dados gerais (não-especializados) de proteínas*

Banco de Dados	Cry8Ka5		Cry1Ac	
	Proteína(s) Similar(es)	Propriedade(s) da(s) Proteína(s) Similar(es)	Proteína(s) Similar(es)	Propriedade(s) da(s) Proteína(s) Similar(es)
Uniprot-trEMBL [¶]	Proteínas Cry de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)	Proteínas Cry de <i>Bt</i>	Não-tóxica(s), antinutricional(is) e/ou alergênica(s)

*O algoritmo utilizado foi BLASTP 2.2.27+ e a matriz de pontuação BLOSUM62. Foram considerados relevantes os resultados com E-value < 0.01, identidade > 20% e espaços (“gaps”) ≤ 6%.

[†]Banco de dados do *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

[#]Nenhuma proteína similar encontrada de acordo com os parâmetros estabelecidos.

[‡]Acesso em: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SCG9>

[¶]Acesso em: <http://web.expasy.org/cgi-bin/blast/blast.pl>

Tabela 2.3 - Pesquisa de similaridade na sequência de aminoácidos primária das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac em banco de dados de proteínas alergênicas

Bancos de Dados	Endereço eletrônico	Cry8Ka5			Cry1Ac		
		Sequência completa [†]	Janela de 80 aa's [‡]	8 / 7 / 6 aa's contíguos [¶]	Sequência completa	Janela de 80 aa's	8, 7 ou 6 aa's contíguos
AllergenOnline	http://www.allergenonline.org /databasefasta.shtml	0 [*]	0	0 / - [§]	0	0	0 / - ³
ADFS	http://allergen.nihs.go.jsp	0	0	0 / 0 / 1	0	0	0 / 0 / 16
Allermatch™	http://allermatch.org/	0	0	0 / 0 / 1	0	0	0 / 0 / 12
SDAP	http://fermi.utmb.edu/SDAP/	0	0	0 / 0 / 1	0	0	0 / 0 / 10

^{*}Número de sequências similares encontradas de acordo com as especificidades para cada parâmetro analisado.

[†]Para ser considerado relevante a identidade deve ser superior a 70% (AALBERSE, 2000).

[‡]Para ser considerado relevante a identidade deve ser superior a 35% (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

[¶]Para ser considerado relevante a identidade deve ser de 100% (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

[§]Nessa base dados não é possível fazer uma pesquisa para 7 ou 6 aminoácidos contíguos.

Tabela 2.4 - Avaliação da presença de peptídeos de Cry8Ka5 e Cry1Ac detectados em proteínas alergênicas em epítomos de alérgenos depositados no banco de dados ADFS (“Allergen Database for Food Safety”)*

Proteína	Nº†	Peptídeo‡	Banco de Dados/Nome da proteína¶	Fonte do alérgeno§	Epítomo¥
Cry8Ka5	1	⁶⁸ LGWLGL ⁷³	ADSF/ Iso-Ara h3	<i>Arachis hypogaea</i> (Amendoim)	-#
Cry8Ka5	2	²⁶¹ MTLTVL ²⁶⁶	Allermatch e SDAP/ Fel d 7 allergen	<i>Felis silvestres catus</i> (Gato doméstico)	-
Cry1Ac	1	²⁵⁰ GSAQGI ²⁵⁵	ADSF/ Major pollen allergen Pha a 1	<i>Phalaris aquatica</i> (Alpiste)	-
Cry1Ac	2	³¹⁰ GNAAPQ ³¹⁵	Allermatch e ADFS/ Major pollen allergen Jun v 1	<i>Juniperus virginiana</i> (Cedro vermelho)	-
Cry1Ac	2	³¹⁰ GNAAPQ ³¹⁵	Allermatch e ADFS/ Major pollen allergen Jun a 1	<i>Juniperus ashei</i> (Cedro Branco de Ozark)	-
Cry1Ac	2	³¹⁰ GNAAPQ ³¹⁵	Allermatch e ADFS/ Major allergen Cup a 1; ADFS/ Putative allergen Cup a 1	<i>Cupressus arizonica</i> (Cipestre do Arizona)	-
Cry1Ac	2	³¹⁰ GNAAPQ ³¹⁵	ADSF/ Putative allergen jun o 1	<i>Juniperus oxycedrus</i> (Zimbro espinhosa)	-

Tabela 2.4 (CONTINUAÇÃO) - Avaliação da presença de peptídeos de Cry8Ka5 e Cry1Ac detectados em proteínas alergênicas em epítomos de alérgenos depositados no banco de dados ADFS (“Allergen Database for Food Safety”)*

Proteína	Nº†	Peptídeo‡	Banco de Dados/Nome da proteína¶	Fonte do alérgeno§	Epítomo¥
Cry1Ac	3	³²¹ QLGQGV ³²⁶	ADFS/ Glutenin	<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)	-
Cry1Ac	4	³⁶⁴ LPSAVY ³⁶⁹	Allermatch/ U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	<i>Homo sapiens</i> (Humano)	-
Cry1Ac	5	⁵⁰² ASVTPI ⁵⁰⁷	Allermatch e ADFS/ Mala s 12 allergen	<i>Malassezia sympodialis</i> (Levedura)	-
Cry1Ac	6	⁵²⁰ SNTVPA ⁵²⁵	ADFS e SDAP/Kappa-casein	<i>Bos taurus</i> (Gado doméstico)	⁶³ YYQQKPVALINNQFLPYP YYAKPAAVRSPAQILQWQL SNTVPAKSC ¹⁰⁹
Cry1Ac	7	⁵²⁶ TATSLD ⁵³¹	Allermatch, ADFS e SDAP/ Glycinin G3	<i>Glycine max</i> (Soja)	-
Cry1Ac	7	⁵²⁶ TATSLD ⁵³¹	Allermatch, ADFS e SDAP/ Glycinin G2	<i>Glycine max</i> (Soja)	-
Cry1Ac	7	⁵²⁶ TATSLD ⁵³¹	Allermatch, ADFS e SDAP/ Glycinin G1	<i>Glycine max</i> (Soja)	-

Tabela 2.4 (CONCLUSÃO) - Avaliação da presença de peptídeos de Cry8Ka5 e Cry1Ac detectados em proteínas alergênicas em epítomos de alérgenos depositados no banco de dados ADFS (“Allergen Database for Food Safety”)*

Proteína	Nº†	Peptídeo‡	Banco de Dados/Nome da proteína¶	Fonte do alérgeno§	Epítomo‡
Cry1Ac	8	⁵⁵² GNIVGV ⁵⁵⁷	Allermatch/ Acidic Cyn d 1 isoallergen isoform 1	<i>Cynodon dactylon</i> (Grama bermuda)	-
Cry1Ac	8	⁵⁵² GNIVGV ⁵⁵⁷	Allermatch e SDAP/ Acidic allergen Cyn d 1; ADFS e SDAP/ Acidic Cyn d 1 isoallergen isoform 3, Acidic allergen Cyn d 1	<i>Cynodon dactylon</i> (Grama bermuda)	-

* Acesso em: <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>

† Número definido de acordo com a posição do peptídeo dentro da sequência primária da proteína.

‡ Peptídeos encontrados na pesquisa de similaridade das proteínas em estudo com sequências de 6 aminoácidos contíguos de proteína alergênicas.

¶ Determinado de acordo com a base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/E5D2Z5>).

§ Determinado de acordo com a base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/E5D2Z5>).

‡ Considerado relevante somente com 100% de identidade.

Peptídeo não-detectado em nenhum epítomo depositado no banco de dados.

Na Figura 2.1, está mostrado o resultado da pesquisa de sítios potenciais de N-glicosilação na sequência da proteína Cry8Ka5, de acordo com o programa NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Um sítio potencial na posição 573 da sequência da entomotoxina é mostrado. Da mesma forma, na Figura 2.2 é possível ver o resultado para a proteína Cry1Ac, onde sítios potenciais nas posições 170, 410, 452 e 470 da sequência da mesma são mostrados.

Figura 2.2 - Resultado da pesquisa de sítios potenciais de N-glicosilação na sequência da proteína Cry1Ac de acordo com o programa NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Sítios potenciais nas posições 170, 410, 452 e 470 são mostrados



5.3 Modo de ação e especificidade

A pesquisa na literatura científica especializada acerca do modo de ação e especificidade das proteínas Cry de *Bt*, bem como da proteína em estudo Cry8Ka5 revelou um grande número de resultados (TABELA 2.5). Dentre esses, ca. de 2.000 para a pesquisa com as palavras-chaves combinadas “mode of action” e “*Bacillus thuringiensis*” e 433 para a combinação “mode of action” e “Cry proteins”. Quando às duas combinações foi adicionada a palavra “specificity”, o número de resultados caiu para 181 e 40, respectivamente. Além disso, quando combinado “mode of action” e “Cry8 proteins” ou “Cry8Ka5” os números foram 5 e 2, respectivamente. Assim, os estudos do modo de ação das proteínas Cry têm sido muito intensos e, de forma geral, existe um consenso sobre como se dá sua atuação nos organismos-alvo.

De acordo com a revisão de Sanahuja *et al.* (2011), em linhas gerais, as toxinas *Bt* são ativadas no ambiente alcalino do intestino médio dos insetos por proteases específicas. Daí resulta boa parte do caráter inócuo das proteínas Cry para mamíferos. Uma vez ativada por proteólise, cada toxina liga-se a receptores nas membranas da borda em escova, causando a abertura de poros na mesma. Isso interrompe o movimento de solutos através do epitélio intestinal e faz com que ocorra um influxo de água. Atualmente, os principais estudos enfocam na descoberta das bases moleculares do mecanismo de ação. Dois modelos são mais difundidos. O primeiro e mais aceito sugere que os domínios II e III inicialmente ligam-se a receptores primários (caderinas) que clivam a toxina dentro do domínio I e induzem a oligomerização, a qual, por sua vez, promove a ligação de alta afinidade com os receptores secundários amarrados à membrana por meio de âncoras de C-terminal de glicosilfosfatidilinositol [mais detalhes podem ser consultados em Soberón *et al.* (2009) e Bravo *et al.* (2007)]. O segundo, descrito por Zhang *et al.* (2006) e, dito alternativo, sugere que a ligação inicial desencadeia uma cascata de sinalização Mg²⁺-dependente que causa o acúmulo de AMPc dependente da proteína G e ativação da proteína cinase A.

Quanto aos estudos sobre o modo de ação das proteínas Cry8, especificamente da Cry8Ka5, sabe-se que as mesmas seguem os princípios gerais estabelecidos para as proteínas Cry de três domínios. Além disso, receptores específicos para a proteína Cry8Ka5 já foram identificados no inseto-alvo, *A. grandis* (NAKASU *et al.*, 2010). No que diz respeito à

especificidade, já é relatado na literatura que proteínas Cry8 são ativas somente contra insetos coleópteros (BRAVO *et al.*, 1998).

Tabela 2.5 - Pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed* do NCBI acerca do modo de ação e especificidade das proteínas Cry de *Bt*, bem como da proteína em estudo Cry8Ka5

	Palavras-Chaves da Pesquisa	Número de Resultados
1	“mode of action” e “ <i>Bacillus thuringiensis</i> ”	2020
2	“mode of action” e “ <i>Bacillus thuringiensis</i> ” e “specificity”	181
3	“mode of action” e “Cry proteins”	433
4	“mode of action” e “Cry proteins” e “specificity”	40
5	“mode of action” e “Cry8 proteins”	5
6	“mode of action” e “Cry8Ka5”	2

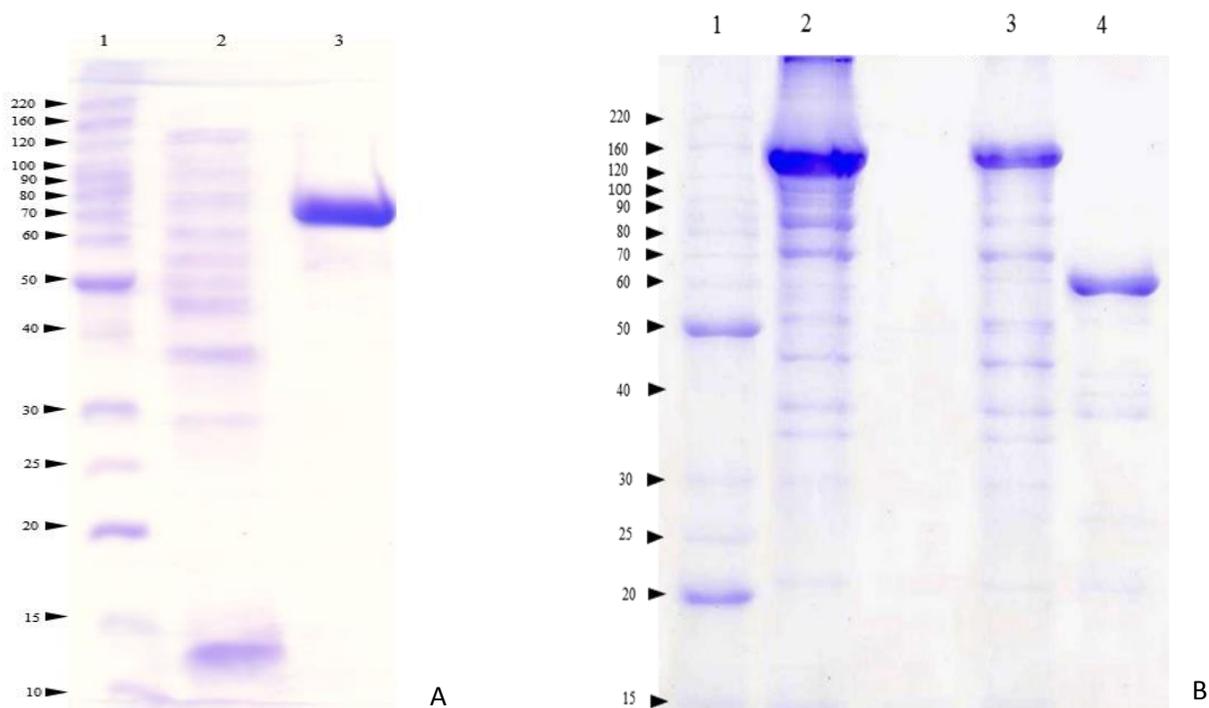
* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

5.4 Obtenção das proteínas Cry

Foi obtido ca. de 1,0 g de cada proteína, Cry8Ka5 e a controle Cry1Ac, para serem utilizados nos ensaios propostos neste capítulo. O perfil eletroforético sob condições desnaturantes das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac, bem como de algumas etapas referentes à expressão e purificação das mesmas, está mostrado na Figura 2.3. Ambas as entomotoxinas apresentaram massa moleculares aparentes próximas a do marcador de massa molecular de 70,0 kDa e, ainda, àquelas calculadas *in silico* a partir de suas sequências primárias através de uma ferramenta “on line” do ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/), Cry8Ka5 de 73,2 kDa e Cry1Ac 65,0 kDa. Além disso, é possível observar alguns contaminantes de massa molecular aparente inferior àquela das proteínas em estudo. A partir do perfil eletroforético foi possível estimar a pureza relativa das proteínas, utilizando o “software” Image Master 2D platinum (v.7.0, GE Healthcare). De acordo com o perfil das proteínas na Figura 2.3, a amostra liofilizada de Cry8Ka5 apresenta 70,4%, enquanto a de Cry1Ac 76,8%. Aproximadamente, os diferentes lotes de expressão e purificação das proteínas produziram amostras com pureza superior a 70 %, chegando a valores de quase 90%.

Para confirmar a identidade das proteínas produzidas, além da massa molecular aparente, as proteínas do gel de eletroforese foram eletrotransferidas para membranas de PVDF e conduzidas para determinação da sequência N-terminal em um sequenciador automatizado. A sequência obtida para Cry1Ac foi IETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGF que é 100% idêntica a várias entradas para a mesma proteína (P05068, E3TBL1, Q6XLN7) na base de dados UniProtKB/Swiss-Prot. Da mesma forma, a sequência obtida para Cry8Ka5 foi SEGYDNKYFANPEVFAAPGGITTGIT que, por sua vez, é 100% idêntica à sequência nucleotídica depositada pelo grupo que desenvolveu a proteína mutante (OLIVEIRA *et al.*, 2011), com código de entrada (número de acesso) G8XRZ1.

Figura 2.3 - A) Perfis eletroforéticos dos produtos de expressão heteróloga da proteína Cry8Ka5 em gel de poliacrilamida (12,5%) em condições redutoras e desnaturantes. Raia 1: Marcador de massa molecular BenchMark Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); Raia 2: Pico não retido da cromatografia em resina Ni-NTA; Raia 3: Pico retido da cromatografia em resina Ni-NTA eluído com 20 mM de imidazol. B) Perfis eletroforéticos dos produtos de expressão heteróloga da proteína Cry1Ac em gel de poliacrilamida (12,5%) em condições redutoras e desnaturantes. Raia 1: Marcador de massa molecular BenchMark Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, EUA); Raia 2: Pró-toxina Cry1Ac não dialisada; Raia 3 – Pró-toxina Cry1Ac dialisada; Raia 4: Toxina Cry1Ac após tripsinização e diálise



5.5 Digestibilidade *in vitro* e estabilidade à temperatura

Como mostrado na Figura 2.4, ambas as proteínas recombinantes, Cry8Ka5 e a controle Cry1Ac, são altamente susceptíveis à digestão em FGS, sendo degradadas em apenas 2 min de incubação. Por outro lado, na Figura 2.5 estão mostrados que tanto Cry8Ka5 quanto a proteína controle Cry1Ac foram resistentes à digestão em FIS, não sendo completamente degradadas em até 30 min. Embora, Cry8Ka5 tenha se mostrado mais susceptível à digestão em FIS do que Cry1Ac.

Quanto à estabilidade térmica das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, na Figura 2.6 é possível visualizar o resultado da incubação de ambas as proteínas a 100 °C por 10, 30 e 60 min. Tanto a Cry8Ka5 quanto a Cry1Ac mostraram-se resistentes ao tratamento térmico por 1 h, apesar de a primeira ter se mostrado levemente mais susceptível.

Figura 2.4 - Digestão em fluido gástrico simulado (FGS) de Cry8Ka5 (A) e de Cry1Ac (B), ambas na concentração de 0,25 mg/mL, em diferentes tempos de incubação a 37 °C. M, marcadores de massa molecular: 14,4; 20,1; 31,0; 45,0; 66,2; 97,0; 116,0; 212,0 kDa; P, Cry8Ka5 ~66,0 kDa sem FGS; P', Cry1Ac ~66,0 kDa sem FGS; FGS, fluído sem incubação; FGS', fluído com incubação por 0; 30 min

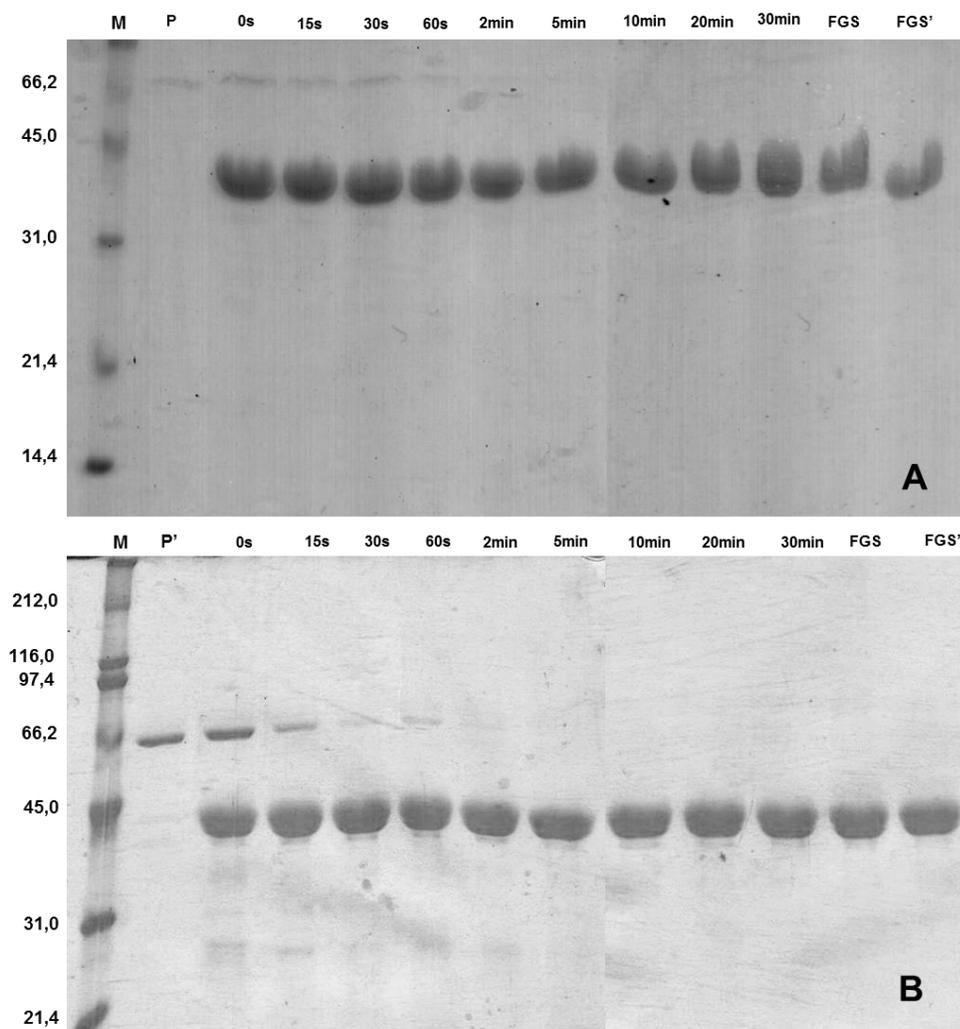


Figura 2.5 - Digestão em fluido intestinal simulado (FIS) de Cry8Ka5 (A) e de Cry1Ac (B), ambas na concentração de 0,25 mg/mL, em diferentes tempos de incubação a 37 °C. M, marcadores de massa molecular: 14,4; 20,1; 31,0; 45,0; 66,2; 97,0; 116,0; 212,0 kDa; P, Cry8Ka5 ~66,0 kDa sem FIS; P', Cry1Ac ~66,0 kDa sem FIS; FIS, fluido sem incubação; FIS', fluido com incubação por 0; 30 min

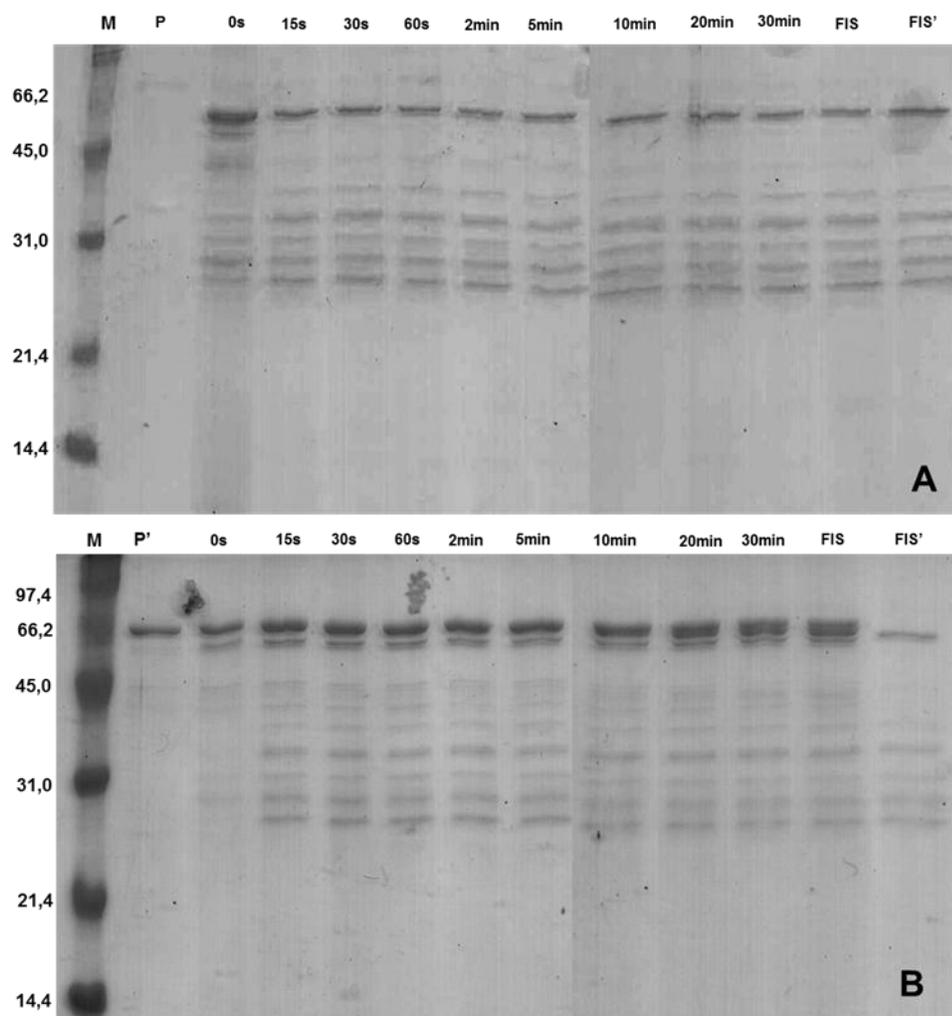
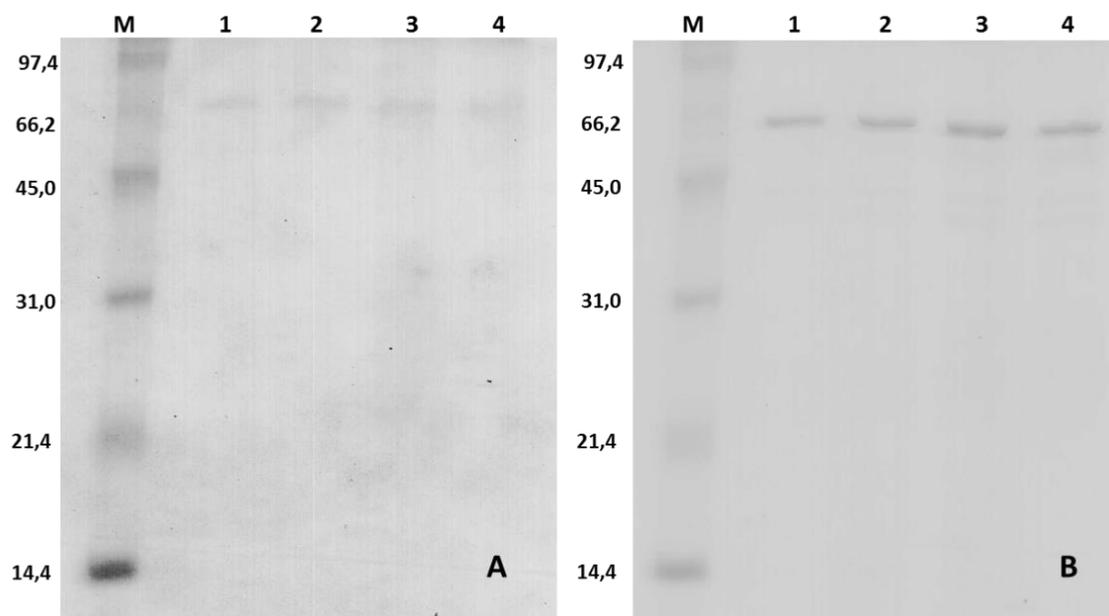


Figura 2.6 - Teste de estabilidade térmica da Cry8Ka5 (A) e de Cry1Ac (B), ambas na concentração de 0,25 mg/mL em tampão de solubilização específico. M, marcadores de massa molecular: 14,4; 20,1; 31,0; 45,0; 66,2 kDa; 1, Cry8Ka5 ~66,0 kDa (A) e Cry1Ac ~66,0 kDa (B) à 4 °C; 2 – 4, Cry8Ka5 (A) e Cry1Ac (B) submetidas à 100 °C por 10; 30 e 60 min



5.6 Toxicidade aguda (dose única) via oral em camundongos

Camundongos fêmeas (n=5/grupo) foram submetidos a uma dose única, 5.000 mg/ Kg de peso corpóreo, via gavagem, de cada proteína, Cry8Ka5 ou Cry1Ac, e a um terceiro grupo foi administrado somente água destilada. Após administração das substâncias, os animais foram observados para verificação de quaisquer mudanças comportamentais e/ou aparição de indícios de toxicidade. Após 14 dias de observações, não foram registrados quaisquer sintomas aparentes de intoxicação, bem como qualquer comportamento anormal, seja nos animais do grupo teste quanto naqueles dos grupos controle. Além disso, foi mensurado o peso corporal de todos os camundongos ao longo dos 14 dias de observação (dias 1, 3, 7, 10 e 14). Esses dados foram plotados num gráfico como mostrado no Gráfico 2.1. Os animais do grupo controle (água destilada) em média apresentaram uma discreta tendência a ganhar mais peso corpóreo do que os animais dos demais grupos. Contudo, essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$) para nenhuma das medições (dias) realizadas.

Ao final dos 14 dias de observação, os animais foram sacrificados e seus órgãos internos dissecados para mensuração do peso úmido relativo dos mesmos. Na Tabela 2.6 é mostrado o peso úmido relativo dos principais órgãos de camundongos fêmeas, tratadas com dose única, via oral, da proteína Cry8Ka5 ou da proteína controle Cry1Ac ou apenas com o veículo água destilada. Após análise estatística, não foi detectada qualquer diferença significativa ($p > 0,05$) entre o peso úmido relativo dos órgãos do grupo Cry8Ka5 comparado ao grupo Cry1Ac ou Água, ou do grupo Cry1Ac comparado ao grupo Água.

Quanto à determinação dos parâmetros hematológicos dos camundongos dos diferentes grupos, foi coletado sangue dos animais ao final do período experimental e conduzido para leitura em um analisador hematológico. Os valores dos parâmetros medidos estão mostrados na Tabela 2.7. Dentre todos os parâmetros analisados, chamou atenção apenas o número de leucócitos do grupo Cry8Ka5 ($5,28 \pm 0,41 \cdot 10^3/\mu\text{L}$) e do grupo Cry1Ac ($7,02 \pm 0,61 \cdot 10^3/\mu\text{L}$) que foram significativamente menores ($p < 0,05$) do que do grupo Água ($8,38 \pm 0,87 \cdot 10^3/\mu\text{L}$), mas que não foram diferentes entre si ($p > 0,05$). A contagem de plaquetas do grupo Cry8Ka5 ($507,00 \pm 47,02 \cdot 10^3/\mu\text{L}$) foi também significativamente menor ($p < 0,05$) que do grupo Água ($689,25 \pm 39,70 \cdot 10^3/\mu\text{L}$), mas foi semelhante ($p > 0,05$) ao do grupo Cry1Ac ($620,50 \pm 52,56 \cdot 10^3/\mu\text{L}$). Além disso, a contagem de linfócitos apresentou um número menor de células ($p < 0,05$) para o grupo

Cry1Ac ($4,18 \pm 0,43 \cdot 10^3/\mu\text{L}$) do que para o Água ($6,30 \pm 0,63 \cdot 10^3/\mu\text{L}$), mas o grupo Cry8Ka5 ($3,50 \pm 0,18 \cdot 10^3/\mu\text{L}$), por sua vez, não foi diferente ($p > 0,05$) dos demais. Por fim, o valor de RDW-CV do grupo Cry1Ac ($17,48 \pm 0,77\%$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que do grupo Água ($16,20 \pm 0,66\%$), mas ambos não foram diferentes do grupo Cry8Ka5 ($17,52 \pm 0,55\%$).

Procedeu-se também a análise dos parâmetros séricos dos animais de todos os grupos, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.8. Foram detectadas diferenças entre os grupos de camundongos apenas para os valores de proteínas totais, AST e uréia. A dosagem de proteínas totais no soro dos camundongos do grupo Cry1Ac ($6,49 \pm 0,64$ g/dL) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao valor médio do grupo Água ($6,75 \pm 1,00$ g/dL), mas nenhum dos grupos foi diferente ($p > 0,05$) do grupo Cry8Ka5 ($6,49 \pm 0,64$ g/dL). Os valores de AST do grupo Cry8Ka5 ($248,50 \pm 10,92$ U/L) e Cry1Ac ($244,67 \pm 5,36$ U/L) foram ambos significativamente maiores ($p < 0,05$) do que aquele do grupo Água ($230,33 \pm 2,25$ U/L). Quanto à dosagem de ureia sérica, o grupo Cry8Ka5 ($62,68 \pm 5,33$ mg/dL) apresentou valor superior ($p < 0,05$) àqueles apresentados pelos grupos Cry1Ac ($44,28 \pm 4,50$ mg/dL) e Água ($48,33 \pm 3,79$ mg/dL), iguais ($p > 0,05$) entre si.

Durante a dissecação dos órgãos dos animais de todos os grupos experimentais não foi observada nenhuma alteração macroscópica digna de nota. Posteriormente, os órgãos dissecados foram conduzidos para análise histopatológica. Nenhuma observação histopatológica relacionada a um grupo específico foi encontrada. Os poucos achados espontâneos observados foram, em termos de severidade, de mínimo para leve, sendo distribuídos aleatoriamente entre todos os grupos e frequentemente observados nos camundongos do grupo Água (dados não mostrados). Na Figura 2.7, é possível visualizar imagens capturadas através de um microscópio óptico de luz de todos os órgãos de pelo menos um animal/grupo experimental. Nessas é possível constatar a presença de qualquer injúria ou dano aos tecidos/células fixadas.

Gráfico 2.1 - Evolução do peso corpóreo (g) de camundongos fêmeas (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única ($5.000 \text{ mg/ kg peso corpóreo}^{-1}$) das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac (proteína Cry de referência) e apenas com o veículo, água destilada, durante 14 dias. Os valores são médias \pm desvios-padrão para cada dia de pesagem, sendo todos os desvios-padrão $\leq 5\%$. As medições do peso corpóreo nos dias mencionados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$; One-way ANOVA) entre os grupos

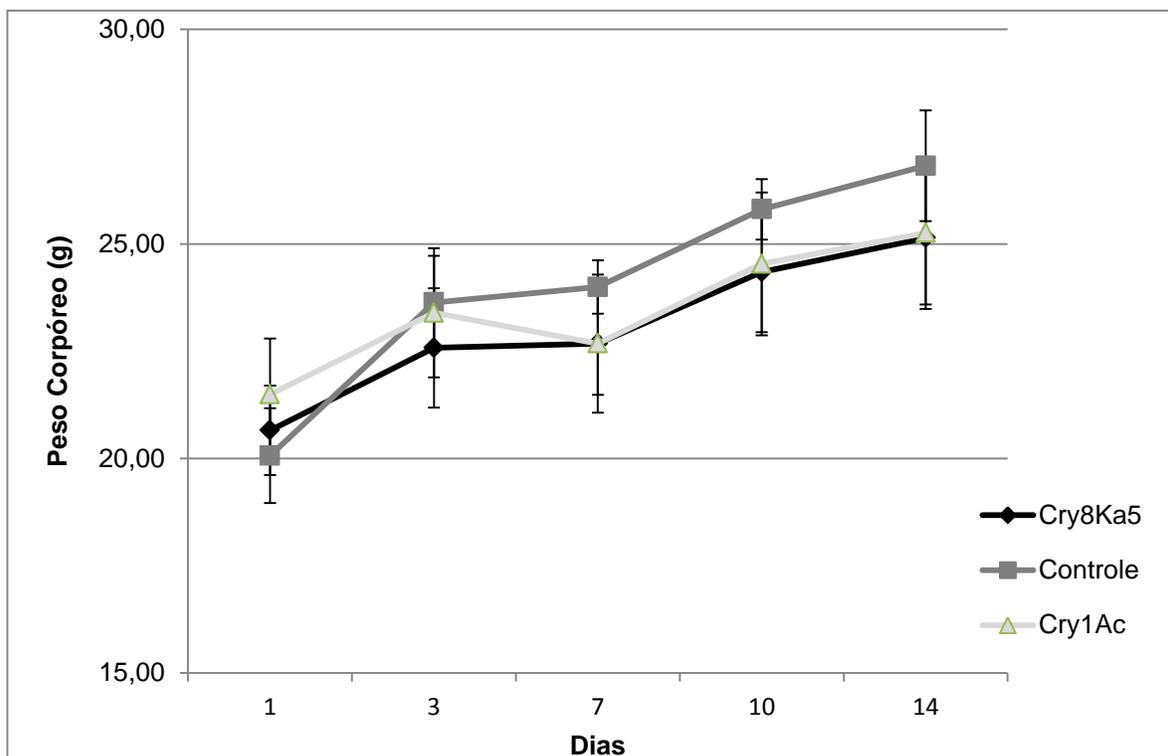


Tabela 2.6 - Peso úmido relativo (%) dos órgãos de camundongos fêmeas (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5.000 mg/ kg peso corpóreo⁻¹) das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac (proteína Cry de referência) e apenas com o veículo, água destilada*

Órgãos	Grupos		
	Cry8Ka5	Cry1Ac	Água
Cérebro	2,58 ± 0,28	2,47 ± 0,23	2,46 ± 0,14
Timo	0,47 ± 0,10	0,45 ± 0,05	0,41 ± 0,10
Coração	0,89 ± 0,11	0,84 ± 0,08	0,90 ± 0,12
Pulmões	0,93 ± 0,09	0,88 ± 0,09	0,89 ± 0,11
Baço	0,38 ± 0,04	0,40 ± 0,07	0,39 ± 0,09
Estômago	1,25 ± 0,10	1,06 ± 0,19	1,17 ± 0,20
Duodeno	2,97 ± 0,61	2,73 ± 0,15	2,92 ± 0,28
Jejuno	2,56 ± 0,47	2,20 ± 0,34	2,64 ± 0,35
Íleo	1,87 ± 0,11	1,75 ± 0,24	1,81 ± 0,29
Intestino Grosso	3,85 ± 0,35	3,34 ± 0,47	3,15 ± 0,27
Pâncreas	0,90 ± 0,29	0,83 ± 0,20	0,69 ± 0,15
Fígado	7,53 ± 0,53	7,17 ± 0,55	7,29 ± 0,57
Rins	2,04 ± 0,13	2,03 ± 0,13	2,06 ± 0,13
Bexiga	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,13 ± 0,02
Ovários	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Tubas uterinas + útero	0,64 ± 0,16	0,59 ± 0,15	0,57 ± 0,10

*Os valores são médias ± desvio padrão (n = 5); p > 0,05 (One-way ANOVA) para o grupo Cry8Ka5 comparado com o grupo Água, para Cry8Ka5 comparado ao grupo Cry1Ac e para o Cry1Ac comparado água.

Tabela 2.7 - Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5.000 mg/ kg peso corpóreo⁻¹) das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac (proteína Cry de referência) e apenas com o veículo, água destilada*

Parâmetros analisados	Grupos		
	Cry8Ka5	Cry1Ac	Água
Leucócitos (10 ³ /μL)	5,28 ± 0,41 ^b	7,02 ± 0,61 ^c	8,38 ± 0,87
Hemácias (10 ¹² /μL)	8,34 ± 0,48	8,54 ± 0,41	8,45 ± 0,43
Hemoglobina (g/dL)	13,72 ± 0,58	13,96 ± 0,95	13,72 ± 0,58
Hematócrito (%)	35,66 ± 1,86	36,58 ± 2,25	37,06 ± 0,36
Volume Corpuscular Médio – V.C.M. (fL)	42,76 ± 1,41	42,84 ± 1,89	42,58 ± 3,92
Hemoglobina Corpuscular Média – H.C.M. (pg)	16,46 ± 0,49	16,34 ± 0,60	16,24 ± 0,28
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média – C.H.C.M. (g/dL)	38,50 ± 0,55	38,14 ± 0,64	37,02 ± 1,63
Plaquetas (10 ³ /μL)	507,00 ± 47,02 ^b	620,50 ± 52,56	689,25 ± 39,70
Linfócitos (10 ³ /μL)	3,50 ± 0,18	4,18 ± 0,43 ^c	6,30 ± 0,63
Neutrófilos, Basófilos e Monócitos (10 ³ /μL)	1,93 ± 0,20	2,65 ± 0,11	2,63 ± 0,66

Tabela 2.7 (CONCLUSÃO) - Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5.000 mg/ kg peso corpóreo⁻¹) das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac (proteína Cry de referência) e apenas com o veículo, água destilada*

Parâmetros analisados	Grupos		
	Cry8Ka5	Cry1Ac	Água
RDW-SD [#] (fL)	28,84 ± 1,07	29,76 ± 1,51	27,70 ± 1,09
RDW-CV [†] (%)	17,52 ± 0,55	17,48 ± 0,77 ^c	16,20 ± 0,66

*Os valores são médias ± desvio padrão (n = 5);

[#]Amplitude de distribuição das hemácias medido como desvio padrão;

[†]Amplitude de distribuição das hemácias medido como desvio padrão.

^ap < 0,05 (ANOVA) para o grupo Cry8Ka5 comparado com o grupo Cry1Ac;

^bp < 0,05 (ANOVA) para o grupo Cry8Ka5 comparado com o grupo Água.

^cp < 0,05 (ANOVA) para o grupo Cry1Ac comparado com o grupo Água;

Tabela 2.8 - Parâmetros séricos de camundongos fêmeas (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5.000 mg/ kg peso corpóreo⁻¹) das proteínas recombinantes Cry8Ka5 e Cry1Ac (proteína Cry de referência) e apenas com o veículo, água destilada*

Parâmetros analisados	Grupos		
	Cry8Ka5	Cry1Ac	Água
Proteínas Totais (g/dL)	6,49 ± 0,64	6,75 ± 1,00 ^c	5,39 ± 0,37
Albumina (g/dL)	3,53 ± 0,19	3,57 ± 0,24	3,56 ± 0,33
Fosfatase Alcalina (U/L)	94,00 ± 7,38	77,43 ± 6,95	88,57 ± 8,81
AST [#] (U/mL)	248,50 ± 10,92 ^b	244,67 ± 5,36 ^c	230,33 ± 2,25
ALT [†] (U/mL)	157,41 ± 7,48	156,94 ± 3,98	156,47 ± 4,30
Ureia (mg/dL)	62,68 ± 5,33 ^b	44,28 ± 4,50	48,33 ± 3,79
Creatinina (mg/dL)	0,46 ± 0,05	0,43 ± 0,11	0,44 ± 0,05
Colesterol (mg/dL)	119,33 ± 19,98	117,53 ± 11,20	107,22 ± 22,09
Triglicérides (mg/dL)	210,65 ± 77,16	154,17 ± 10,30	180,56 ± 30,45

* Os valores são médias ± desvio padrão (n = 5).

[#]Aspartato aminotransferase;

[†]Alanina aminotransferase.

^a p < 0,05 (ANOVA) para o grupo Cry8Ka5 comparado com o grupo Cry1Ac.

^b p < 0,05 (ANOVA) para o grupo Cry8Ka5 comparado com o grupo Água.

^c p < 0,05 (ANOVA) para o grupo Cry1Ac comparado com o grupo Água.

Figura 2.7 - Secções histológicas coradas com HE dos órgãos de camundongos fêmeas tratados com dose única via oral de 5.000 mg/kg de peso corpóreo da proteína Cry8Ka5 ou Cry1Ac ou água destilada. A análise histopatológica não constatou danos inerentes à veiculação das Cry aos animais. As imagens dos diferentes tecidos foram capturadas em diferentes aumentos de forma a representar melhor a estrutura do órgão: cérebro, escala da barra = 50µm; timo, 100µm; coração, 50µm; pulmão, 100µm; estômago, 100µm; duodeno, 50µm; ceco, 100µm; baço, 50µm; pâncreas, 50µm; fígado, 50µm; rim, 50µm; bexiga, 100µm; ovário, 50µm; tuba uterina, 100µm; e, útero 100µm

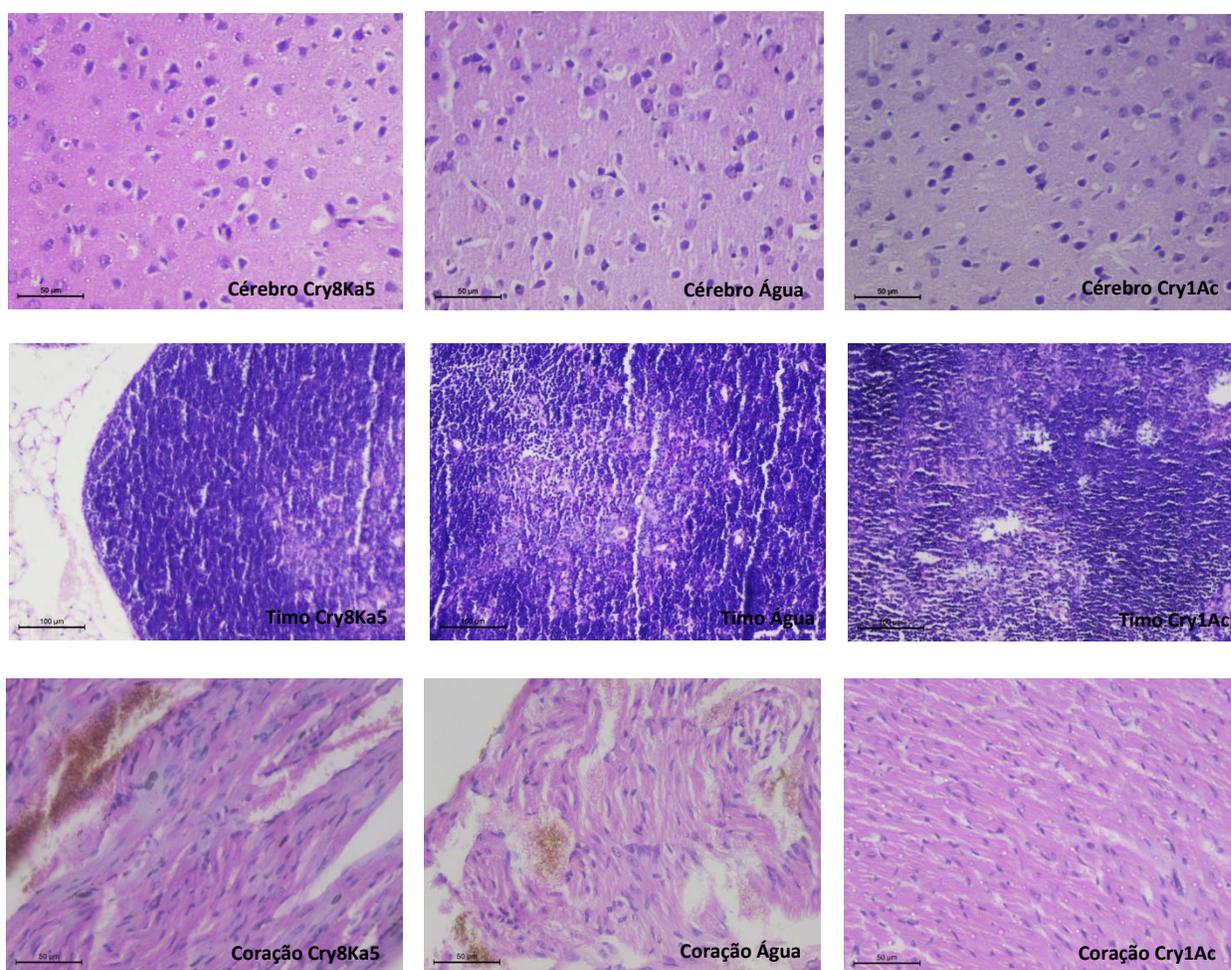


Figura 2.7 (CONTINUAÇÃO) - Secções histológicas coradas com HE dos órgãos de camundongos fêmeas tratados com dose única via oral de 5.000 mg/kg de peso corpóreo da proteína Cry8Ka5 ou Cry1Ac ou água destilada

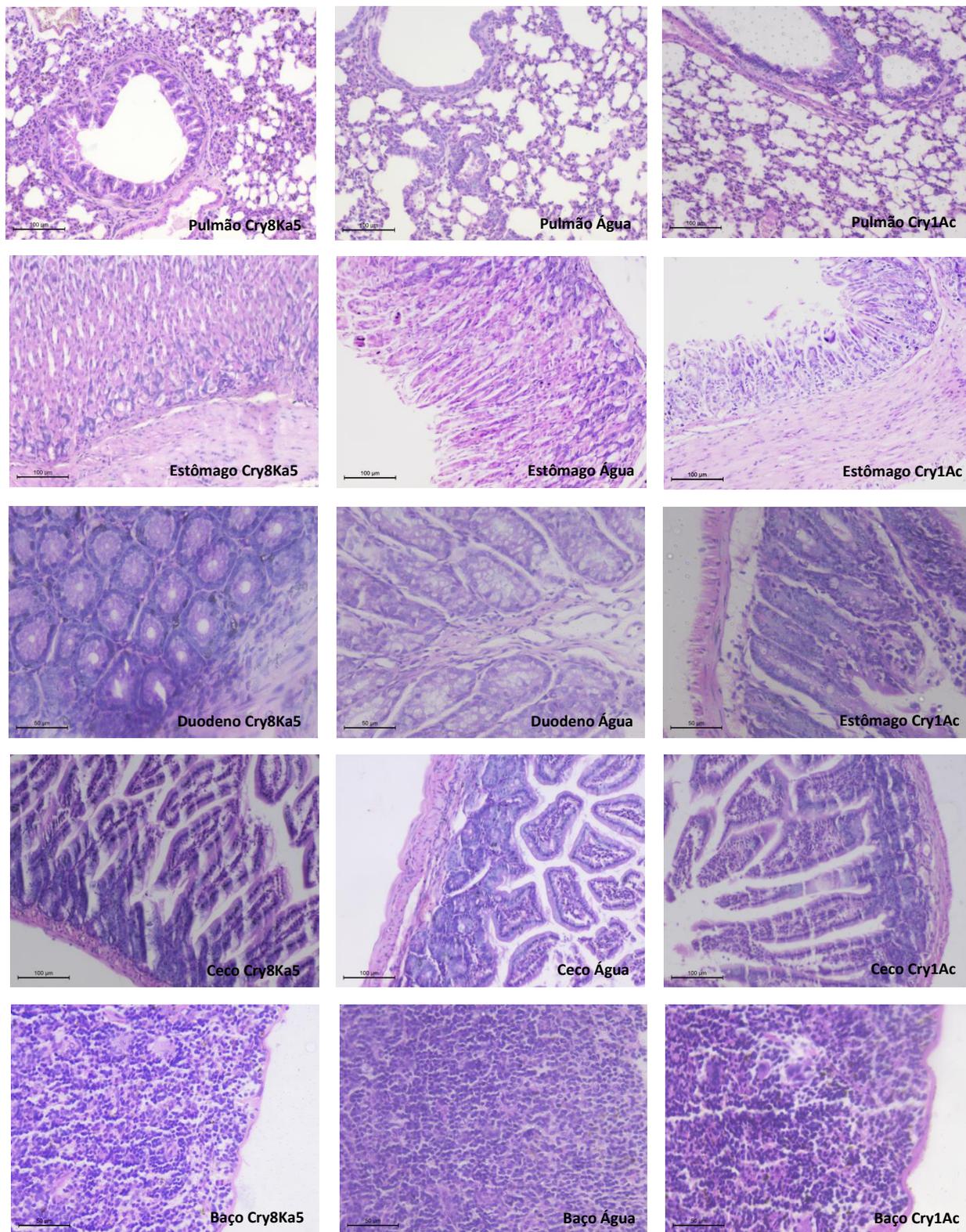


Figura 2.7 (CONTINUAÇÃO) - Secções histológicas coradas com HE dos órgãos de camundongos fêmeas tratados com dose única via oral de 5.000 mg/kg de peso corpóreo da proteína Cry8Ka5 ou Cry1Ac ou água destilada

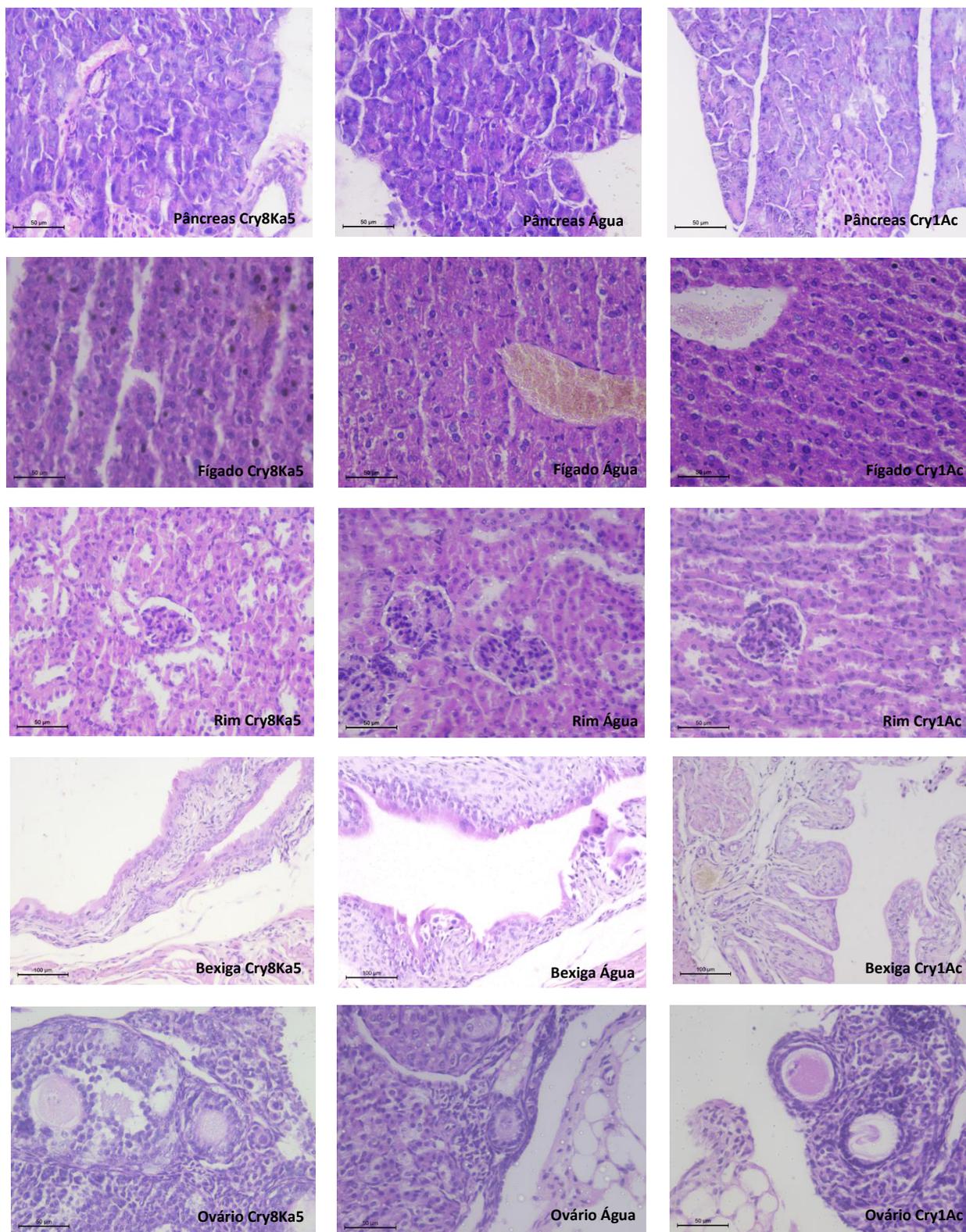
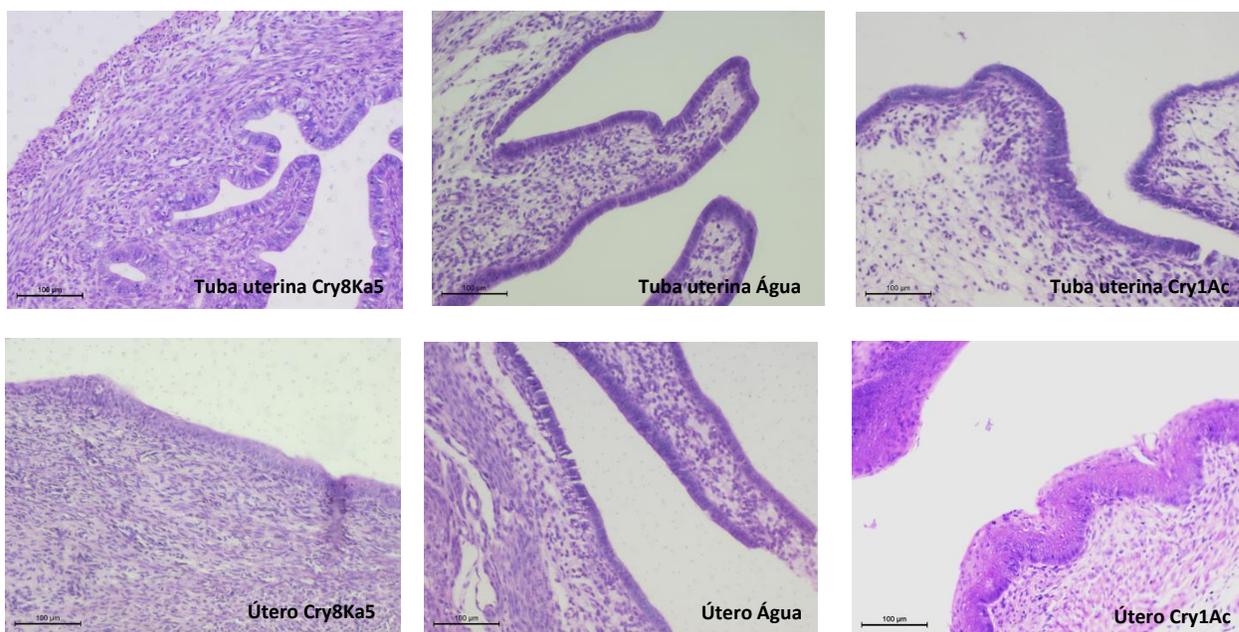


Figura 2.7 (CONCLUSÃO) - Secções histológicas coradas com HE dos órgãos de camundongos fêmeas tratados com dose única via oral de 5.000 mg/kg de peso corpóreo da proteína Cry8Ka5 ou Cry1Ac ou água destilada



6 DISCUSSÃO

Atualmente, além da avaliação da biossegurança alimentar de plantas GM, grande atenção tem sido dada à avaliação da segurança de novas proteínas expressas em cultivares transgênicos de importância agrícola (PENG *et al.*, 2007; JUBERG *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009). Até mesmo é indicado que uma avaliação de segurança pré-transformação vegetal deva ser realizada a fim de garantir previamente que o novo OGM expressa uma nova proteína inócua.

Neste contexto, Delaney *et al.* (2008) propuseram uma abordagem em duas etapas baseada em pesos de evidência para avaliar a segurança de proteínas transgênicas. A Etapa 1 (identificação de perigos potenciais) inclui uma avaliação do modo de ação e a aplicação a qual se destina a proteína, avaliação do histórico de uso seguro (HOSU) da proteína, comparação da sequência de aminoácidos da proteína com outras proteínas reconhecidamente tóxicas, antinutricionais e/ou alergênicas, e, uma avaliação de certas propriedades físicas da proteína transgênica. Os estudos indicados na Etapa 2 (caracterização do perigo) são realizados quando os resultados da primeira não são suficientes para determinar a segurança da proteína, sendo realizados, portanto, novos testes numa abordagem caso-a-caso. No caso de proteínas incorporadas a plantas para conferir proteção, estudos de toxicidade aguda são recomendados e, conseqüentemente, ditarão a necessidade de outros ensaios toxicológicos ou de alergenicidade.

Portanto, neste estudo optou-se por adotar a referida abordagem em duas etapas devido ao seu caráter holístico e, além do que, a mesma contempla todas as exigências da CTNBio no que concerne à avaliação de segurança de consumo das proteínas recombinantes para humanos e animais. Sendo assim, a primeira etapa da avaliação de biossegurança alimentar da proteína Cry8Ka5 iniciou a partir de pesquisa na literatura científica para fundamentação do histórico de uso seguro da fonte do gene *cry8Ka* e da própria Cry8Ka5 ou de proteínas estruturalmente relacionadas a ela. Um importante aspecto positivo é que a literatura especializada já acumula inúmeros relatos sobre a utilização segura de produtos à base de *Bt* na agricultura como pesticidas (KUMAR; CHANDRA; PANDEY, 2008; SANAHUJA *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2011; HAMMOND; KOCH, 2012). Há mais de 50 anos as formulações inseticidas *Bt* para dispersão aérea são utilizadas por produtores agrícolas, incluindo produtores orgânicos (DELANEY *et al.*, 2008). Por outro lado, é bastante conhecido que as formulações *Bt* são compostas por uma mistura de endo- e exotoxinas, que incluem proteínas Cry e Cyt, ambas endotoxinas, além de proteínas VIP, que são exotoxinas. As proteínas Cry e VIP são

especificamente tóxicas para certos grupos de insetos, enquanto as Cyt apresentam elevada atividade citolítica contra vários tipos celulares, incluindo células de mamíferos (KUMAR; CHANDRA; PANDEY, 2008). Contudo, não há nenhuma evidência que sugira que o *Bt* é perigoso para seres humanos e outros mamíferos, e, na verdade, os estudos realizados até agora sugerem que formulações *Bt* são um dos produtos microbianos mais seguros já conhecidos (SANAHUJA *et al.*, 2011; HAMMOND; KOCH, 2012).

Outro fator que diminui qualquer perigo associado à ingestão de formulações *Bt* e que é uma das desvantagens do uso dos “sprays” *Bt* na agricultura é a baixa atividade residual dos cristais e proteínas sob condições ambientais (FREDERICI; SIEGEL, 2008; SANAHUJA *et al.*, 2011). Dada a sua ampla e longa utilização, é notável que exista apenas um relato de injúria causada a humanos pelo *Bt*, onde esporos de *Bt* foram encontrados numa úlcera de córnea de um fazendeiro que acidentalmente molhou o rosto com a formulação DiPel® (BURGES, 2001). Para se ter uma ideia, experimentos de toxicidade com voluntários humanos mostraram que indivíduos que se alimentaram com 10^{10} esporos por 5 dias ou inalaram 10^9 esporos de *Bt* não apresentaram sintomas de intoxicação (SIEGEL; SHADDUCK, 1989). Outro ponto positivo a favor do uso de produtos *Bt* é que o microrganismo em si não é considerado como uma fonte de proteínas alergênicas. Por fim, a Agência Americana de Proteção Ambiental (US EPA) considera que alimentos tratados com produtos *Bt* são seguros, podendo ser consumidos imediatamente após a colheita (<http://www.epa.gov/oppfead1/cb/ppdc/2002/may02transcript.htm>).

No que diz respeito ao histórico de uso seguro da proteína Cry8Ka5 ou de proteínas estruturalmente ou funcionalmente relacionadas à mesma, há mais de 15 anos variedades de milho, algodão e de outras culturas GM expressando proteínas Cry são plantadas em vários países sem ter sido relatado qualquer efeito adverso do consumo desses OGM ou de seus derivados em humanos e animais (HAMMOND; KOCH, 2012). Além disso, um grande número de testes de segurança, especialmente estudos *in vivo* com roedores de laboratório, tem sido realizado com proteínas Cry isoladas ou incorporadas nas plantas GM, tendo sido observado no geral uma tendência para a inocuidade dessas proteínas para mamíferos (DRIZGA *et al.*, 2007; JUBERG *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012). Existem alguns relatos de efeitos imunogênicos das proteínas Cry1Ac (MORENO-FIERROS *et al.*, 2000; VAZQUEZ-PADRON *et al.*, 2000) e da Cry1Ab (FINAMORE *et al.*, 2008). Contudo, esses resultados têm sido bastante questionados quanto a sua relevância no contexto de avaliação

da biossegurança alimentar dessas proteínas, uma vez que seus desenhos experimentais estão muito distantes da real situação de exposição a essas substâncias (HAMMOND; KOCH, 2012).

Quanto ao histórico de uso seguro da proteína Cry8Ka5 em si, é possível estender em parte toda história de consumo dos produtos *Bt*, incluindo formulações para dispersão aérea, plantas *Bt* e de outras Cry, para a proteína em estudo. Proteínas Cry de três domínios compartilham grandes similaridades estruturais que, por sua vez, estão diretamente relacionadas ao seu modo de ação e especificidade (SANAHUJA *et al.*, 2011; HAMMOND; KOCH, 2012). Além disso, é sabido que proteínas Cry8 atuam seletivamente em coleópteros, tendo já sido descritos potenciais receptores no intestino médio de *A. grandis* para a Cry8Ka5 (NAKASU *et al.*, 2008). Contudo, mudanças na estrutura primária de proteínas podem acarretar em modificações na estrutura secundária que, por sua vez, podem interferir na digestibilidade e ter consequências sobre o potencial imunogênico e alergênico da nova proteína (XU *et al.*, 2009).

Apesar de terem sido suscitados alguns aspectos negativos relacionados a perigos potenciais associados ao consumo de produtos *Bt* e das proteínas Cry, seus históricos de uso seguro são bastante contundentes e embasados por uma vasta quantidade de dados científicos. Mesmo assim, os resultados dos testes posteriores da Etapa 1 de avaliação da biossegurança alimentar da Cry8Ka5 poderão acumular mais evidências de peso para atestar a inocuidade dessa proteína.

Um dos pontos-chave da avaliação de biossegurança de uma nova proteína é a comparação de similaridade de sua sequência de aminoácidos com proteínas tóxicas, antinutricionais e/ou alergênicas. Por esta razão, uma comparação da sequência de aminoácidos completa da proteína Cry8Ka5 e da Cry1Ac, utilizada como controle experimental, foi realizada como parte das recomendações do Codex Alimentarius (2009) e, ainda, em concordância com a avaliação de biossegurança alimentar em duas etapas sugerida por Delaney *et al.* (2008). Para tanto, foi realizada uma comparação da sequência das proteínas Cry com proteínas depositadas em oito grandes bancos de dados de domínio público. De acordo com os parâmetros utilizados, as análises revelaram a ausência de similaridade das proteínas em estudo com outras proteínas com propriedades tóxicas, antinutricionais e/ou alergênicas depositadas. Delaney *et al.* (2008) em estudo de biossegurança alimentar com a proteína Cry1Ab demonstraram também a ausência de similaridade dessa endotoxina com outras proteínas de natureza tóxica ou alergênica nos mesmos bancos de dados. Da mesma forma, Randhawa, Singh e Grover (2011) não detectaram

similaridades das proteínas Cry1Ac, Cry1Ab, Cry2Ab, Cry1Ca e Cry1Fa/Cry1Ca com proteínas alergênicas sob as mesmas condições.

As sequências da Cry8Ka5 e Cry1Ac foram comparadas às de proteínas alergênicas depositadas em quatro bancos de dados desenvolvidos para predição de potencial alergênico de acordo com recomendações da FAO, da OMS e do Codex. De acordo com Aalberse (2000), se uma proteína compartilha mais de 70% de identidade ao longo de sua sequência com um alérgeno é bem provável que aconteça reação cruzada ou que compartilhem os mesmos epítomos para IgE. Ambas as proteínas não apresentaram identidade (> 70%) de sua sequência completa de aminoácidos com nenhuma proteína alergênica. O mesmo resultado para Cry1Ac foi encontrado por Randhawa, Singh e Grover (2011).

Outro parâmetro utilizado na pesquisa de similaridade com alérgenos é o alinhamento da sequência da nova proteína numa janela de 80 aminoácidos (aminoácido 1 a 80, aminoácido 2 a 81 e assim por diante) com sequências de proteínas alergênicas, sendo levados em conta os alinhamentos com identidade maior que 35% entre as sequências comparadas (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). A fundamentação desse teste baseia-se na presença de epítomos descontínuos, ditos também conformacionais, que mesmo a razoável distância uns dos outros dentro da sequência primária e unidimensional da proteína são capazes de se ligarem a IgE quando a proteína encontra-se em sua forma nativa, ou seja, tridimensional (KLETER; PEIJNENBURG, 2002). Para Cry8Ka5 e Cry1Ac não foram detectadas nenhuma similaridade de acordo com esse requerimento. Os mesmos resultados foram encontrados para as proteínas Cry1C (CAO *et al.*, 2010) e Cry1Ab/Ac (XU *et al.*, 2009). Esse é um dos testes mais relevantes para investigação de potencial alergênico de uma proteína através de ferramentas de bioinformática. Mishra *et al.* (2012) investigaram o potencial alergênico de novas proteínas potencialmente úteis para o desenvolvimento de plantas transgênicas, detectando elevados percentuais de identidade (37,5 a 97,5%) entre as sequências de seis dessas moléculas com alérgenos. Além disso, os mesmos autores avaliaram a relevância desses achados submetendo uma dessas proteínas, uma quitinase de *Trichoderma viride*, a um teste de reação cruzada *in vitro* utilizando o soro de pacientes alérgicos a alimentos, onde constaram significante ligação a IgE.

Ainda dentro da pesquisa de potencial alergênico de novas proteínas, pesquisas de segmentos de aminoácidos contíguos idênticos em banco de dados de alérgenos são também realizados para identificar sequências de aminoácidos que possam representar epítomos lineares

de ligação a IgE (KLETER; PEIJNENBURG, 2002). Usualmente, são feitas pesquisas de 8 aminoácidos contíguos, mas buscas por 7 e 6 aminoácidos contíguos têm sido recomendadas (LAIDCS, 2008). Há relatos que sequências de 4 e 6 aminoácidos foram capazes de ser reconhecidas e efetivamente ligaram-se a IgE presente no soro de pacientes alérgicos (KLETER; PEIJNENBURG, 2002). Na pesquisa de similaridade de 8 ou 7 aminoácidos contíguos não foi encontrada nenhuma sequência idêntica no banco de dados de alérgenos àquela da Cry8Ka5 e da Cry1Ac. De fato, de acordo com Kleter e Peijnenburg (2002) não existem no mercado plantas transgênicas carreando proteínas exógenas, como é o caso da Cry1Ac, que apresentem identidade de 100% de sequências de 8 ou mais aminoácidos com proteínas alergênicas.

Por outro lado, na pesquisa de 6 aminoácidos contíguos foram encontradas 2 e 8 sequências diferentes para Cry8Ka5 e Cry1Ac, respectivamente. Para avaliar se as mesmas estão presentes em regiões de epítomos lineares de IgE, esses peptídeos foram comparados a sequências de um banco de dados com vários epítomos anotados. As duas sequências, LGWLGL da proteína “Iso-Ara h3” do amendoim e MTLTVL da proteína “Fel d 7 allergen” do gato, idênticas às sequências da Cry8Ka5 não estão presentes em nenhum epítomo linear. Além disso, para ter alguma importância no que diz respeito à capacidade de elicitar uma resposta imunológica a partir de ligação de IgE, as duas sequências deveriam ser epítomos para anticorpos IgE, uma vez que proteínas que possuem um única região de ligação a IgE não são capazes de provocar uma reação alérgica (GANGLBERGER *et al.*, 2001). Para a proteína Cry1Ac, utilizada como referência para este estudo, foram encontradas 8 sequências diferentes de 6 aminoácidos com 100% identidade com sequências de alérgenos. Contudo, nenhuma proteína alergênica identificada possui mais do que uma das sequências de 6 aminoácidos, o que já é limitante para sua imunogenicidade. Além disso, apenas uma sequência, SNTVPA da “Kappa-casein” do gado doméstico, faz parte do epítomo linear dessa proteína. Como dito anteriormente, apesar da elevada homologia (escore 99% e E-value < 0,01) entre as sequências do alérgeno e da Cry1Ac, um único epítomo para IgE não é suficiente para desencadear uma resposta imunológica. Também, não foi possível saber pelos dados de bioinformática se é um epítomo linear para IgE ou IgG. Kleter e Peijnenburg (2002) em estudo *in silico* sobre o potencial alergênico (ligação a IgE) de peptídeos de 6 aminoácidos de Cry1Ac idênticos aos de proteínas alergênicas demonstraram que mesmo duas sequências diferentes presentes num mesmo alérgeno, no caso uma proteína do cedro vermelho (*J. virginiana*), não apresentavam relevância imunológica, pois ambas possuíam

baixa antigenicidade de acordo com o método de predição de Hopp e Woods (1981). Os mesmos autores ainda alertaram em seu estudo para o grande número de falsos positivos quando se utiliza o número mínimo de 6 aminoácidos para identificação de epítomos para IgE, mas defendem seu uso acompanhado de testes *in silico* adicionais para evitar os falsos negativos que podem surgir numa pesquisa de 8 aminoácidos. Por outro lado, outros autores defendem que a pesquisas de aminoácidos contíguos deve ser no mínimo com 8 aminoácidos e uma redução do número levaria a um aumento crescente do número de falsos positivos (HILEMAN *et al.*, 2002). Na verdade, os métodos *in silico* continuam sendo aperfeiçoados para diminuir o número de falsos positivos em pesquisas de sequências curtas, de epítomos conformacionais e epítomos contendo glicanas. De uma forma geral, a proteína Cry8Ka5 não apresentou similaridade significativa com nenhuma proteína alergênica que seja passível de desencadear uma resposta imune. Da mesma forma, já bastante utilizada Cry1Ac não apresentou nenhum dado conclusivo sobre seu potencial alergênico o que é corroborado pela ausência de relatos de casos em humanos e animais mesmo depois de mais de 15 anos no mercado.

É sabido que muitas proteínas alergênicas são glicosiladas, o que, por sua vez, levanta a possibilidade de que esses grupos glicosil estejam estreitamente relacionados com seu caráter alergênico (JENKINS; PAREKH; JAMES, 1996). Por sua vez, proteínas de origem microbiana geralmente não são glicosiladas, mesmo que possuam em suas sequências primárias sítios para N-glicosilação. Isso acontece porque bactérias não possuem o retículo endoplasmático que é responsável pelo processamento dessa modificação pós-traducional (LEROUGE *et al.*, 1998). Contudo, o princípio básico da transformação genética é a inserção de um ou mais genes exógenos em um novo genoma e este, por sua vez, pode estar associado a uma maquinaria celular capaz de executar modificações posteriores na(s) nova(s) molécula(s). Dessa forma, a proteína Cry8Ka5 foi também avaliada quanto à presença de qualquer sítio potencial de N-glicosilação baseando-se na presença de determinadas sequências consenso. As sequências pesquisadas foram Asparagina-Xaa-Serina/Treonina (onde Xaa representa qualquer aminoácido exceto Prolina) e Asparagina-Xaa-Cisteína, através do programa *on line* NetNGlyc 1.0 Server desenvolvido para predição de sítios de N-glicosilação em proteínas humanas, mas que tem sido muito utilizado para pesquisa desses sítios em proteínas de outras origens (HÉROUET *et al.*, 2005; HÉROUET-GUICHENEY *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009).

Apenas um sítio potencial na sequência da Cry8Ka5 foi encontrado, enquanto na Cry1Ac foram mostrados quatro sítios potenciais. Xu *et al.* (2009) utilizaram o mesmo programa para pesquisar sítios de N-glicosilação na proteína de fusão Cry1Ab/Ac, onde detectaram também quatro sítios potenciais. Os mesmos autores realizaram um teste *in vitro* para confirmar essa predição, mas o resultado não se repetiu. Isso aponta também para possíveis falsos positivos no teste *in silico*. Apesar do número razoável de relatos sobre a potente imunogenicidade da Cry1Ac em condições experimentais (MORENO-FIERROS *et al.*, 2000; VÁZQUEZ-PADRÓN *et al.*, 1999; VÁZQUEZ-PADRÓN *et al.*, 2000a,b), isso não está relacionado à glicosilação dessa proteína, uma que vez a molécula utilizada nesses ensaios foi obtida de origem bacteriana (*E. coli*). Provavelmente, a imunogenicidade da Cry1Ac esteja relacionada a uma característica particular da região N-terminal comum a todas as proteínas Cry (GUERRERO *et al.*, 2004). Além disso, na prática, não existem relatos de quadros alérgicos em humanos decorrentes do consumo de alimentos GM contendo a proteína Cry1Ac. Herouet-Guicheney *et al.* (2009) alertam também sobre a importância de se conhecer bem o local de expressão da proteína exógena na planta transgênica. Por exemplo, a enzima mutante 2mEPSPS que confere tolerância à aplicação de herbicida ao milho GM possui dois sítios para N-glicosilação, mas essa é expressa e transportada pelo cloroplasto, local onde não ocorre tal modificação pós-traducional. Sendo assim, a veracidade desse achado para a Cry8Ka5 deve ser, primeiramente, confirmada através de teste *in vitro*, bem como modelos estruturais adicionais dessa molécula podem contribuir para tal fim. Outro ponto importante é a caracterização dos transformantes, ou seja, das plantas de algodão portando o cassete contendo o Cry8Ka5 no que concerne ao(s) local(is) de inserção do mesmo no genoma da(s) planta(s).

Talvez devido a sua importância econômica, especialmente com o advento dos transgênicos, as proteínas Cry têm sido amplamente estudadas quanto ao seu mecanismo de ação, estando, provavelmente, entre as toxinas mais bem estudadas. Existe um consenso geral sobre os princípios gerais que delineiam o modo de ação das endotoxinas de *Bt*. Dentre esses, residem pontos que atestam positivamente para a biossegurança do *Bt* e, especificamente, das proteínas Cry. Primeiro, a atuação das proteínas Cry se dá essencialmente em ambiente alcalino no intestino dos insetos, enquanto nos mamíferos esse ambiente vai de ácido a neutro. Segundo, a necessidade de proteases específicas, preferencialmente serínicas, para ativação das proteínas Cry. Apesar de mamíferos possuírem aparato enzimático desse tipo, barreiras anteriores como a

acidez do estômago e a presença de pepsina geralmente impedem o avanço das Cry para a porção intestinal (SÓBERON *et al.*, 2009; SANAHUJA *et al.*, 2001). Terceiro e último, a existência de vários receptores específicos no intestino médio dos insetos para as proteínas e, por sua vez, ausência em mamíferos e em outros organismos não-alvo (SÓBERON *et al.*, 2009). Esses receptores chegam a ter especificidade ao nível de Família dentro da Classe Insecta. Essas especificidades são comuns a todas as proteínas Cry de três domínios. No caso da Cry8Ka5 sabe-se também que o gene *cry8* é específico para coleópteros (BRAVO *et al.*, 1998). Além disso, vários receptores para Cry8Ka5 foram encontrados em larvas do coleóptero *A. grandis* (NAKASU *et al.*, 2010).

Com exceção das proteínas do pólen, todas as proteínas alergênicas conhecidas têm alta resistência à degradação enzimática. Portanto, isso pode ser usado como um indicador do potencial alergênico de uma proteína (ASTWOOD; FUCHS, 1996). Tem sido relatado que proteínas que são rapidamente hidrolisadas em peptídeos e aminoácidos simples < 3,5 kDa por pepsina são menos prováveis de serem alergênicas (FU; ABBOTT; HATZOS, 2002). Por isso, o teste de resistência à digestão *in vitro* por pepsina e pancreatina (mistura de enzimas que atuam no intestino), tem sido amplamente indicado para avaliação do potencial alergênico de uma nova proteína (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). As proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac foram altamente susceptíveis à digestão em fluido gástrico simulado, sendo degradadas em apenas 2 min. Outras proteínas Cry avaliadas, tais como Cry1Ab (SANDERS *et al.*, 1998), Cry1C (CAO *et al.*, 2010) e Cry1Ab/Ac (XU *et al.*, 2009), mostraram-se bastante susceptíveis a ação da pepsina. Tal susceptibilidade da Cry8Ka5 é importante do ponto de vista de sua segurança para consumo como comentado previamente. Por outro lado, tanto Cry8Ka5 quanto a Cry1Ac foram resistentes à digestão em fluido intestinal simulado por todo o tempo de duração do teste (30 min). Embora, Cry8Ka5 tenha se mostrado mais susceptível do que a Cry1Ac. A resistência da Cry1Ac à digestão por pancreatina já havia sido relatada. No entanto, quando a mesma foi submetida à digestão sequencial, os peptídeos que chegaram ao fluido intestinal simulado foram completamente digeridos (US EPA, 2010). Esse fato não tem grande relevância, pois as proteínas são eficientemente digeridas no estômago, chegando ao intestino como peptídeos de baixa massa molecular (di- ou tripeptídeos).

Usualmente, a estabilidade térmica de uma proteína tem sido associada à presença de potencial alergênico. Por isso, o teste de estabilidade ao tratamento térmico é indicado para

avaliação de biossegurança alimentar de novas proteínas a fim de avaliar seu potencial alergênico. Assim, ambas as proteínas recombinantes foram submetidas a tratamento térmico a 100 °C por 10, 30 e 60 min. A Cry8Ka5 e a controle Cry1Ac mostraram-se resistentes ao tratamento térmico por 1h. Xu *et al.* (2009) mostraram que a proteína Cry1Ab/Ac também se mostrou resistente ao tratamento térmico sob as mesmas condições. A importância desse achado é de difícil interpretação e, além do que, esse teste tem sido severamente criticado sobre a sua real utilidade no contexto de um estudo de biossegurança alimentar, tendo sido desencorajada a sua execução em testes posteriores (PRIVALLE *et al.*, 2011).

Ao término da Etapa I de avaliação da biossegurança alimentar da proteína Cry8Ka5, foi possível constatar que a mesma não apresenta qualquer perigo em potencial, atendendo, por vezes, e de forma superior a Cry1Ac, aos requerimentos para a segurança de consumo para humanos e animais. Contudo, para biopesticidas é indicado que seja realizado, pelo menos, um teste de toxicidade aguda via oral (dose única) que, por sua vez, é parte da Etapa II da avaliação de biossegurança. Em vista disso, camundongos fêmeas foram submetidos a uma dose única (5.000 mg/ Kg de peso corpóreo). Após 14 dias de observações, os animais de todos os grupos não apresentaram quaisquer sintomas aparentes de intoxicação ou comportamento anormal. Os animais dos diferentes grupos também tiveram ganho de peso corpóreo semelhante. O bom estatus da saúde dos animais foi corroborado pelo ganho de peso corpóreo linear e semelhante em todos os grupos. Isso também reflete de forma geral a ausência de efeitos antinutricionais das proteínas administradas, uma vez que é conhecido que algumas classes de proteínas (inibidores de proteases, lectinas etc) interferem na digestão e absorção das proteínas da dieta (CARVALHO *et al.*, 2011). Xu *et al.* (2009) e Cao *et al.* (2010) encontraram o mesmo resultado em estudo com a Cry1Ab/Ac e Cry1C, respectivamente, ambas na dose de 5.000 mg/kg de peso corpóreo.

Ao final dos 14 dias de observação, os animais do grupo teste (Cry8Ka5) e dos grupos controle (Cry1Ac e Água) foram sacrificados e seus órgãos internos dissecados para mensuração do peso úmido relativo. A verificação de aumento e diminuição de órgãos internos pode fornecer indícios sobre processos patológicos decorrentes de intoxicação e/ou efeitos antinutricionais. Por exemplo, quando roedores são submetidos a doses elevadas de inibidores de proteínas via oral é comum um quadro de aumento relativo do pâncreas e de algumas porções do intestino (AL-WESALI *et al.*, 1995). No entanto, não foi observada nenhuma diferença significativa entre o peso úmido relativo dos órgãos do grupo Cry8Ka5 quando comparado aos

grupos Cry1Ac e Água, e nem entre o Cry1Ac e Água. Contudo, algumas variações normais podem ser encontradas na comparação entre o peso úmido relativo de órgãos de grupos teste e controle, como foi o caso dos animais administrados com Cry1Ab/Ac que apresentaram aumento relativo do fígado e do timo e diminuição relativa dos pulmões quando comparados ao grupo Água. Até mesmo, o grupo tratado com albumina sérica bovina apresentou aumento relativo dos pulmões quando comparado ao grupo Água nesse mesmo experimento (Xu *et al.*, 2009). Portanto, tais resultados não devem ser interpretados isoladamente, sendo importante sua análise junto aos demais achados de hematologia e bioquímica do sangue dos animais.

Também se procedeu a análise dos parâmetros hematológicos dos animais de todos os grupos experimentais, Cry8Ka5, Cry1Ac e Água. Dando ênfase na discussão aos achados relevantes relacionados ao grupo teste Cry8Ka5, apenas o número de plaquetas desse grupo diferiu da contagem do grupo controle Água. Baixo número de plaquetas está relacionado à diminuição da produção ou aumento da destruição dessas células. Uma redução da produção estaria relacionada a injúrias ou alterações nos megacariócitos que produzem as plaquetas, enquanto o aumento da destruição dá-se a partir de uma ativação acelerada ou reconhecimento imune das plaquetas (HEDRICH, 2012). Neste momento, é difícil afirmar que essa diminuição (não-acentuada) na contagem plaquetária do grupo Cry8Ka5 esteja relacionada a um dos motivos referidos. Outro ponto importante, é que existe uma grande variação de valores relatados para os parâmetros hematológicos de camundongos da linhagem Swiss, onde dentro dessa variação o grupo Cry8Ka5 seria considerado normal (DINIZ *et al.*, 2006; HEDRICH, 2012). Além do que, esse fato não teria grande importância visto que o número de plaquetas desse grupo não diferiu do outro grupo de referência, Cry1Ac. As demais diferenças detectadas entre o grupo Cr8Ka5 e Cry1Ac ou do Cry1Ac e Água, apesar da diferença significativa em termos estatísticos, não foram acentuadas, podendo ser consideradas variações normais (HEDRICH, 2012). Diferenças pontuais entre os grupos teste e controle também foram detectados na determinação dos parâmetros hematológicos de camundongos tratados com a proteína Cry1C (CAO *et al.*, 2010) e Cry1Ab/Ac (XU *et al.*, 2009), mas quando analisadas juntas ao demais dados da avaliação de biossegurança foram consideradas irrelevantes.

Além da determinação dos parâmetros hematológicos, realizou-se também a determinação dos parâmetros séricos dos camundongos fêmeas dos grupos Cry8Ka5, Cry1Ac e Água (Tabela 8). Poucas diferenças significativas foram detectadas entre os grupos

experimentais. Dentre essas, os níveis de AST dos grupos Cry8Ka5 e Cry1Ac foram sutilmente maiores do que do grupo Água e a dosagem de ureia do primeiro grupo também foi ligeiramente maior do que a do grupo controle Água. Dosagem elevada de AST primeiramente está correlacionada a possível hepatopatia ou a injúrias ao coração e músculos esqueléticos (DUNCAN; PRASSE, 1982). Contudo, nenhum dano aos tecidos do fígado e do coração foi detectado na análise histopatológica. Da mesma forma, o nível de ureia mais elevado no grupo Cry8Ka5 é pouco plausível de explicação, uma vez que tal resultado sugere deterioração da função renal, mas nenhum indício de dano aos rins foi encontrado no estudo histopatológico. Além disso, o nível de creatinina que também é um bom indicador da saúde renal não apresentou diferença entre os grupos (DUNCAN; PRASSE, 1982).

Como dito anteriormente, o estudo histopatológico dos órgãos dos camundongos fêmeas dos grupos experimentais não revelou qualquer injúria ou dano significativo que possa ter sido causado pelas elevadas doses das proteínas administradas. Estudos de biossegurança com as proteínas Cry1Ab/Ac (XU *et al.*, 2009), Cry1C (CAO *et al.*, 2010) e Cry34Ab1 e Cry35Ab1 (JUBERG *et al.*, 2009) tiveram a mesma conclusão sobre a análise histopatológica de camundongos submetidos a uma dose única via oral dessas proteínas.

Assim, é possível afirmar que o NOAEL (“No Observed Adverse Effect Level”) da proteína Cry8Ka5 é 5000 mg/kg peso corpóreo de camundongo. Para a Cry1Ac, utilizada como proteína controle, foi possível confirmar sua inocuidade nas condições testadas e ter seu valor de NOAEL aumentado de 4200 mg/kg, como publicado anteriormente por Betz, Hammond e Fuchs (2000), para 5.000 mg/kg. Muitas outras Cry tiveram resultados semelhantes, por exemplo, Cry1Ab 4.000 mg/kg (BETZ; HAMMOND; FUCHS, 2000), Cry1Ab/Ac 5.000 mg/kg (XU *et al.*, 2009), Cry1C 5.000 mg/kg (CAO *et al.*, 2010) e Cry3A 5.220 mg/kg (BETZ; HAMMOND; FUCHS, 2000).

7 CONCLUSÃO

As conclusões deste capítulo são:

- A fonte do gene *cry8Ka*, o *Bt*, e as proteínas estruturalmente relacionadas a Cry8Ka5, as proteínas Cry, possuem um longo histórico de uso seguro, tendo sido utilizadas por várias décadas na agricultura em formulações para dispersão aérea e,

mais recentemente, incorporadas a plantas transgênicas como biopesticidas. Portanto, não existem relatos relevantes sobre efeitos adversos em humanos e animais não-alvo decorrentes da ingestão dos produtos *Bt* ou das proteínas *Cry*.

- A proteína *Cry8Ka5* não compartilha nenhuma similaridade significativa de sua sequência de aminoácidos primária com aquelas de proteínas tóxicas, antinutricionais e alergênicas depositadas em bancos de dados gerais e específicos de alérgenos.
- A proteína *Cry8Ka5* apresentou um sítio potencial de N-glicosilação através de predição *in silico*, enquanto a proteína *Cry1Ac*, utilizada como controle experimental, apresentou quatro sítios. Contudo, esse resultado deve ser confirmado posteriormente através de teste *in vitro*, bem como deve ser feita uma caracterização do local de inserção do gene *cry8Ka5* no genoma da planta a fim de verificar a possibilidade de glicosilação e, ainda, do potencial alergênico da mesma.
- De forma geral, o modo de ação das proteínas *Cry* já é bem esclarecido, sendo atualmente estudado a nível molecular. Além disso, essas proteínas atuam precisamente contra seus organismos-alvo (insetos de várias classes), sendo ineficazes ou pouco tóxicas para mamíferos e outros organismos não-alvo. Para a proteína *Cry8Ka5* já foram descritos vários receptores no seu alvo *A. grandis*, o que reforça sua especificidade.
- Apesar da proteína *Cry8Ka5* ser resistente a tratamento térmico e à digestão em fluido intestinal simulado, a mesma foi altamente susceptível à digestão em fluido gástrico simulado. Isso aumenta a sua segurança caso seja ingerida.
- A proteína *Cry8Ka5* não causou efeitos adversos relevantes em camundongos submetidos por gavagem a uma dose única elevada dessa proteína (5.000 mg de proteína/Kg de peso corpóreo).
- Por fim, através da avaliação de biossegurança alimentar em duas etapas, baseada em pesos de evidência, é possível concluir que não é esperado qualquer risco associado ao consumo da proteína *Cry8Ka5*. Assim, a proteína *Cry8Ka5* caracteriza-se como uma ferramenta biotecnológica segura para o desenvolvimento de plantas de algodão *Bt* a fim de conferir resistência ao ataque do bicudo-do-algodoeiro.

Capítulo 3

Avaliação dos Efeitos das Proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre Mamíferos a partir de Testes de Citotoxicidade e Efeitos em Microrganismos: Uma Abordagem Complementar



1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA/JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, avanços na engenharia genética levaram ao desenvolvimento de plantas que apresentam resistência a insetos através da incorporação e expressão de genes que codificam δ -endotoxinas, especialmente proteínas Cry, da bactéria Gram-positiva do solo, *B. thuringiensis* (*Bt*). Várias espécies de plantas, particularmente culturas de importância econômica, tais como o milho, algodão, batata, tabaco, tomate e cana de açúcar têm sido modificadas para a produção de proteínas Cry (PRIETO-SAMSONOV *et al.*, 1997; MENDELSON *et al.*, 2003.; ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006; OECD, 2007). Dentre essas, destaca-se a proteína Cry1Ac, uma das primeiras proteínas Cry a ser utilizada para o desenvolvimento de várias culturas *Bt* que ainda hoje são comercializadas (MENDELSON *et al.*, 2003; GATEHOUSE *et al.*, 2011; SANAHUJA *et al.*, 2011). Contudo, antes de introduzir no mercado culturas derivadas da biotecnologia, uma avaliação de riscos exaustiva é necessária para determinar a segurança de consumo desses novos alimentos ou de seus derivados para humanos e animais (BONDIZIO *et al.*, 2008).

Recentemente, foi desenvolvida a proteína mutante Cry8Ka5 ativa contra o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*), a principal praga da cotonicultura no Brasil. Essa nova proteína foi obtida a partir da técnica de evolução molecular dirigida *in vitro*, “DNA shuffling”, aplicada ao gene *cry8Ka1* clonado da cepa brasileira S811 de *Bt*, ativa especificamente contra coleópteros (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Dada a sua atividade promissora, Cry8Ka5 é uma candidata em potencial para o desenvolvimento de um algodão *Bt* resistente a *A. grandis*. Dessa forma, esse biopesticida deve ser rigorosamente testado quanto a sua biossegurança alimentar a fim de detectar potenciais efeitos alérgicos, tóxicos e/ou antimetabólicos (DELANEY *et al.*, 2008).

É bastante relatado na literatura científica que as toxinas Cry de *Bt* não causam efeitos adversos a células de mamíferos, uma vez que essas não possuem sítios receptores específicos para ligação dessas proteínas (NOTEBORN *et al.*, 1996; GILL; ELLAR, 2002; BRODERICK; RAFFA; HANDELSMAN, 2006). No entanto, estudos recentes tem contestado o caráter inócuo das proteínas Cry sobre células de mamíferos, bem como alguns receptores equivalentes têm sido descritos para essas células (KIM *et al.*, 2000; MESNAGE *et al.*, 2012). Além disso, é amplamente conhecida a propriedade antimicrobiana de linhagens de *Bt* e de algumas toxinas Cry, o que levanta uma preocupação sobre os efeitos dessas proteínas na

microbiota do trato gastrointestinal de mamíferos, seja de monogástricos ou de ruminantes (YUDINA *et al.*, 2003; REVINA *et al.*, 2005; YUDINA *et al.*, 2007). Assim, dado o amplo desenvolvimento e crescente uso de culturas GM, incluindo espécies vegetais comestíveis expressando proteínas Cry de *Bt*, novos métodos complementares ou alternativos viáveis para avaliação de biossegurança de alimentos GM para humanos e animais são urgentemente necessários (BONDIZIO *et al.*, 2008).

A fim de contribuir com informações adicionais sobre a biossegurança alimentar da proteína mutante Cry8Ka5 e da proteína amplamente utilizada Cry1Ac, excluindo quaisquer potenciais efeitos deletérios não investigados pelas abordagens oficiais de avaliação de segurança de consumo de novas proteínas, este capítulo propôs a realização de vários testes de citotoxicidade clássicos e alternativos, bem como análise dos efeitos sobre microrganismos dessa entomotoxina. Dentre os testes de citotoxicidade clássicos, foram realizadas avaliações de cito- e genotoxicidade em linfócitos periféricos humanos e pesquisa de atividade hemolítica aliada à análise de topografia de membrana celular em eritrócitos de humanos (tipos A, B, AB e O), coelho e rato por microscopia de força atômica (MFA). Como teste alternativo e amplamente utilizado em “screenings” de compostos citotóxicos, foi avaliado o efeito da Cry8Ka5 e da Cry1Ac sobre a sobrevivência de náuplios de *Artemia* sp. Por último, foram avaliados os efeitos dessa proteína sobre o desenvolvimento de bactérias e leveduras em meio líquido.

A ampla utilização dos testes de citotoxicidade e antimicrobianos propostos, bem como o grande número de relatos científicos sobre a biossegurança alimentar das proteínas Cry de *Bt*, forneceram os subsídios para elaboração das seguintes hipóteses:

A abordagem complementar empregada a partir da realização de testes de cito- e genotoxicidade e de atividade antimicrobiana é adequada para contribuir com informações adicionais sobre a biossegurança alimentar de proteínas recombinantes, neste caso da Cry8Ka5 e da Cry1Ac, utilizando vários controles proteicos e não-proteicos para fins comparativos.

As proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac não apresentam efeitos adversos relevantes sobre linfócitos humanos e eritrócitos de várias espécies de mamíferos, bem como não interferem no crescimento de bactérias e leveduras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este capítulo objetivou avaliar a proteína mutante Cry8Ka5 e a proteína Cry1Ac quanto aos seus efeitos cito- e genotóxicos através de uma série de testes clássicos e alternativos, além de pesquisar seus efeitos antimicrobianos. A partir disso, avaliar a adequabilidade desse tipo de abordagem complementar para a avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a cito- e genotoxicidade in vitro da proteína Cry8Ka5 e da Cry1Ac através do método do MTT (redução do sal de tetrazolium) e ensaio do Cometa (migração do DNA), respectivamente, utilizando linfócitos humanos periféricos saudáveis;
- Avaliar a presença de atividade hemolítica em suspensão de eritrócitos de humanos (tipos A, B, AB e O), coelho e rato, tratados com as proteínas Cry8Ka5, Cry1Ac e vários controles proteicos e não-proteicos;
- Analisar a topografia de membrana celular de eritrócitos humanos (tipo O) em sangue total após tratamento com as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac através de microscopia de força atômica;
- Avaliar a citotoxicidade das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac a partir da sobrevivência de náuplios de *Artemia* sp. após exposição a essas moléculas;
- Avaliar os efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre o crescimento em meio líquido de bactéria e leveduras.
- Avaliar a contribuição da abordagem complementar empregada, utilizando os dados obtidos dos testes de cito- e genotoxicidade e de atividade antimicrobiana das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac no contexto da avaliação da biossegurança alimentar de uma nova proteína para desenvolvimento de plantas transgênicas.

3 MATERIAIS

3.1 Reagentes biológicos

3.1.1 Células humanas

Eritrócitos dos tipos sanguíneos A, B, AB, O e linfócitos periféricos humanos foram obtidos de doadores voluntários adultos, de 20 a 30 anos, de qualquer sexo, como descrito em detalhes na seção de Métodos.

Todos os procedimentos que envolveram seres humanos foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará (UFC) (Fortaleza, Ceará, Brasil) para ser conduzido de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

3.1.2 Microrganismos

Duas cepas de bactérias Gram-positivas, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e duas Gram-negativas, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, foram cedidas pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBiotech), Departamento de Biologia da UFC, e adquiridas inicialmente da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA). As leveduras *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *Pichia anomala* foram obtidas de isolados clínicos, identificadas e mantidas no referido laboratório, enquanto *Saccharomyces cerevisiae* foi adquirida comercialmente na forma de fermento biológico na cidade Fortaleza (Ceará, Brasil).

3.1.3 Naúplios de *Artemia* sp.

Cistos de *Artemia* sp. foram adquiridos comercialmente em lojas de aquarismo na cidade Fortaleza (Ceará, Brasil). Para obtenção dos naúplios do microcrustáceo, uma pequena porção de cistos foi posta para eclodir em 2 L de água do mar artificial (15,15 g de NaCl + 2,98 g de MgCl₂.6H₂O + 2,86 g de MgSO₄.7H₂O + 0,65 g de CaCl₂ + 0,116 g de NaHCO₃ + 0,414 g de

KCl, em 1 L de água destilada dechlorinada), sob iluminação artificial constante, até 48 h antes do momento do ensaio. Nenhum alimento foi adicionado durante esse período.

3.1.4 Animais de laboratório

Um coelho macho da raça Califórnia com três meses de idade foi adquirido junto ao Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFC, Fortaleza, Ceará. O coelho foi mantido no Biotério de Manutenção do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC com água e ração (Biobase, Bio-Tec, São Paulo, Brasil) *ad libitum*.

Três fêmeas de ratos convencionais da linhagem Wistar foram adquiridas com três semanas de idade do Biocen-UFC. Os animais foram alojados no Bioprospec, com condições de temperatura ($23,0 \pm 2,0$ °C), fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) e umidade do ar (45-55%) controladas. Os ratos foram mantidos em número adequado em caixas de polipropileno com substrato de raspa de pinho (Biotécnicas, São Paulo, Brasil) e água e ração (Biobase, Bio-Tec, São Paulo, Brasil) *ad libitum* até atingirem o peso aproximado de 120 g para coleta de sangue.

Todos os protocolos com animais, adotados neste trabalho, foram submetidos à aprovação pela CEPA da UFC, que adota os preceitos do COBEA e obedece à Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regula o uso de animais em pesquisas científicas.

3.2. Reagentes químicos e outros materiais

3.2.1 Proteínas

BSA e ovalbumina (“Egg Whites”) foram adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA).

3.2.2 Reagentes e materiais para expressão, purificação e quantificação das proteínas Cry8Ka5 e CryIAc

Ampicilina, IPTG, lisozima, comassie brilliant blue G-250 e membrana de diálise com poro de 6-8 kDa foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA). A coluna de ácido nitrilotriacético-níquel foi comprada da QIAGEN (Venlo, Holanda), enquanto o imidazol e o DTT foram adquiridos da GE Healthcare (Uppsala, Suécia).

3.2.3 Reagentes e materiais para eletroforese e sequenciamento

Acrilamida, coomassie brilliant blue R-250, SDS, TEMED, trizma-base, metilenobisacrilamida, 2-mercaptoetanol e marcadores de massa molecular foram comprados da AMRESCO Inc. (Solon, OH, EUA). Membranas de PVDF foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA).

3.2.4 Reagentes e materiais para testes in vitro

Ficoll[®], MTT [brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol] e meio de cultura RPMI-1640 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EUA). Placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano e com tampa, estéreis, e demais materiais plásticos foram adquiridos da Costar[®] (Washington, DC, EEUU).

Agar nutritivo, agar sabouraud, caldo nutritivo e caldo BHI (“Brain-Heart Infusion”) foram obtidos da Difco, Becton, Dickinson and Company (Sparks, NV, EUA).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.3 Considerações sobre biossegurança

A legislação e os procedimentos gerais relativos ao manuseio e armazenamento de material oriundo da tecnologia do DNA recombinante foram anteriormente descritos no Capítulo 2. As considerações pertinentes a este capítulo serão apresentadas a seguir.

Além dos laboratórios mencionados anteriormente, os experimentos apresentados neste capítulo foram realizados nos seguintes laboratórios: Laboratório de Microscopia de Força Atômica (os dois na Embrapa Cenargen, Brasília, DF) com extensão de CQB N° 004/96 e o Laboratório de Oncologia Experimental (Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, Fortaleza, CE) com extensão de CQB N° 0102/99.

Os ensaios de cito- e genotoxicidade foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental, enquanto as análises de microscopia de força atômica (MFA) foram realizadas no laboratório de mesmo nome. Os demais experimentos foram realizados nos laboratórios descritos no capítulo anterior.

4 MÉTODOS

4.1 Produção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac em sistema heterólogo (*Escherichia coli*)

Todos os procedimentos pertinentes à obtenção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, que incluem: expressão e purificação das proteínas, quantificação de proteínas solúveis totais, análise da expressão das proteínas por SDS-PAGE, quantificação relativa da pureza das amostras, e, a determinação da sequência N-terminal das proteínas produzidas, estão detalhadamente descritos na seção de Métodos do Capítulo 2.

4.2 Avaliação de cito- e genotoxicidade em linfócitos humanos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

4.2.1 Coleta de sangue periférico e isolamento de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC)

A coleta do sangue periférico foi realizada por profissionais capacitados, utilizando seringas estéreis e descartáveis de 10 mL ou com agulha de segurança (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, EUA). Para tanto, foram escolhidos três voluntários adultos saudáveis, de qualquer sexo, na faixa etária de 20 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, sem exposição recente a radiações, a medicamentos ou álcool (BURIM *et al.*, 2001).

As células mononucleares de sangue periférico foram isoladas a partir de uma amostra de 3 mL de sangue periférico acrescida de 5 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. Essa mistura foi adicionada a um tubo graduado com 2 mL de Ficoll[®] e submetida à centrifugação (Fanem, São Paulo, Brasil) por 2000 x g, por 30 min, a 25 °C. Em seguida, a região intermediária entre as hemácias e o soro, chamada de “nuvem de linfócitos” foi aspirada e adicionada a um terceiro tubo. Posteriormente, foi completado com solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, até o volume de 11 mL, sendo o tubo centrifugado a 108 x g, por 20 min, a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” de linfócitos foi ressuspenso em 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5.

4.2.2 Atividade citotóxica em linfócitos humanos

A avaliação do potencial citotóxico em linfócitos humanos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac foi determinada através do método do MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio] como descrito por Mosmann (1983). Os linfócitos obtidos de indivíduos saudáveis foram cultivados em microplacas de 96 poços numa densidade de 2×10^6 células/mL. Após 24 h do início da cultura, os linfócitos foram expostos às proteínas durante 72 h com concentrações variando de 1,5 a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Uma solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, foi utilizada como controle negativo e a doxorrubicina (0,6 μM) foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (Eppendorf, Modelo 5403, Hamburgo, Alemanha) a 15 x g, por 15 min, a 25 °C, sendo o sobrenadante descartado. Cada poço recebeu 200 μL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e reincubada durante 3 h, em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO_2 . Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (30 x g, por 10 min, a 25 °C), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em 150 μL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram medidas com o auxílio de um espectrofotômetro para microplacas (Beckman Coulter Inc., Modelo DTX-880, Brea, CA, EUA), no comprimento de onda de 550 nm. Os valores de CI_{50} (Concentração Inibitória de 50% das células) e intervalo de confiança (IC 95%) foram calculados a partir de análise de regressão não-linear. Diferenças significativas entre médias foram calculadas por análise de variância (ANOVA), seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$), utilizando programa estatístico adequado.

4.2.3 Atividade genotóxica em linfócitos humanos

O teste do cometa, também conhecido como “Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE)”, tem sido, rotineiramente, utilizado no estudo do potencial genotóxico de compostos químicos industriais, biocidas, agroquímicos e produtos farmacêuticos. De acordo com o protocolo descrito (LIMA *et al.*, 2007), os linfócitos obtidos de indivíduos saudáveis ($5,0 \times 10^4$ células/mL) foram cultivados na presença de concentrações crescentes (100, 500 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$) de ambas as proteínas, Cry8Ka5 e Cry1Ac, durante 24 h, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO_2 . A solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, foi utilizada como controle negativo e a

doxorubicina (0,6 μ M) como controle positivo. Após o tratamento, as células foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (25 V; 300 mA), durante 20 min. Para coloração das lâminas foi utilizada uma solução de brometo de etídio (20 μ g/mL). As lâminas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Olympus, Modelo BX41, Shinjuku, Tóquio, Japão). A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. Foram contados 100 cometas por lâmina e classificados, por análise visual, dentre cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4) que representam o percentual de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula. O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i, \text{ onde } n_i \text{ é o número de células com nível de dano } i \text{ (0, 1, 2, 3 ou 4).}$$

Logo, os valores de ID podem variar de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo). Para análise estatística dos resultados, diferenças significativas entre médias foram calculadas por análise de variância (ANOVA), seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$), utilizando programa estatístico adequado.

4.3 Avaliação de Atividade Hemolítica das Proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

4.3.1 Coleta de sangue humano e de animais de laboratório para isolamento e preparo de suspensão de eritrócitos

A coleta de sangue humano, a condição de saúde dos doadores e o número de voluntários foram iguais aos descritos no item 4.2.1, com exceção de que foram utilizados três voluntários, de qualquer sexo, para cada tipo sanguíneo, A, B, AB e O. O sangue coletado foi transferido para tubos heparinizados, lentamente homogeneizado e acondicionado a 4 °C, até o momento do isolamento dos eritrócitos.

O sangue do coelho foi coletado a partir de um pequeno corte perpendicular na veia marginal da orelha com bisturi. O sangue foi colhido em tubo heparinado, homogeneizado e acondicionado a 4 °C, até o momento do isolamento dos eritrócitos. Já para a coleta de sangue dos ratos, os animais foram levemente sedados com éter etílico e o sangue coletado através de

punção no plexo retro-orbital com um microtubo de vidro para hematócrito. O sangue foi aparado em microtubos heparinizados, homogeinizados e mantidos a 4 °C.

Uma parte do sangue humano do tipo O foi reservada para análise da topografia de membrana celular com sangue total, enquanto a outra parte foi destinada ao isolamento dos eritrócitos. Todas as outras amostras de sangue foram destinadas somente ao isolamento dos eritrócitos. Assim, para o isolamento dos eritrócitos e preparo de uma suspensão a 2%, todas as amostras de sangue foram centrifugadas (Fanem, São Paulo, Brasil) a 200 x g, por 10 min, a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e do precipitado (“papa de hemácias”), foi retirado 2 mL que foi misturado a 100 mL de NaCl 0,9%. A suspensão foi levemente misturada e acondicionada a 4 °C, por, no máximo, 24 h.

4.3.2 Atividade hemolítica em eritrócitos de humanos e animais de laboratório

A atividade hemolítica das entomotoxinas foi investigada seguindo a metodologia descrita por Merker e Levine (1986) e Bernheimer (1988), com algumas modificações. A presença de hemólise na suspensão de eritrócitos humanos do tipo A, B, AB e O e de eritrócitos de coelho e rato, todas a 2%, foi verificada após incubação por 1 h (30 min a 37 °C e, depois, 30 min a 25 °C) com concentrações crescentes das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, variando de 7,8 a 1.000 µg/mL, numa proporção de 1:2 (v/v). Albumina sérica bovina foi utilizada como controle não-Cry nas mesmas condições. O grau de hemólise foi calculado pela liberação de hemoglobina medida no comprimento de onda de 540 nm, após centrifugação da mistura a 1.000 x g, por 5 min, a 25 °C. A lise completa (100 %) foi obtida por diluição de 200 µL da suspensão de células a 2% em 200 µL de água destilada, utilizando-se ainda um controle negativo com a mesma proporção de células em solução salina. A atividade hemolítica foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $(\text{Abs } 540 \text{ da amostra} - \text{Abs } 540 \text{ do NaCl } 0,9\%) \times 100 / \text{Abs } 540 \text{ da água destilada}$. Os valores de CI_{50} (Concentração que causa hemólise de 50% das células) e intervalo de confiança (IC 95%) foram calculados a partir de análise de regressão não-linear. Diferenças significativas entre médias foram calculadas por análise de variância (ANOVA), seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$), utilizando programa estatístico adequado.

4.4 Análise de topografia de membrana celular via MFA

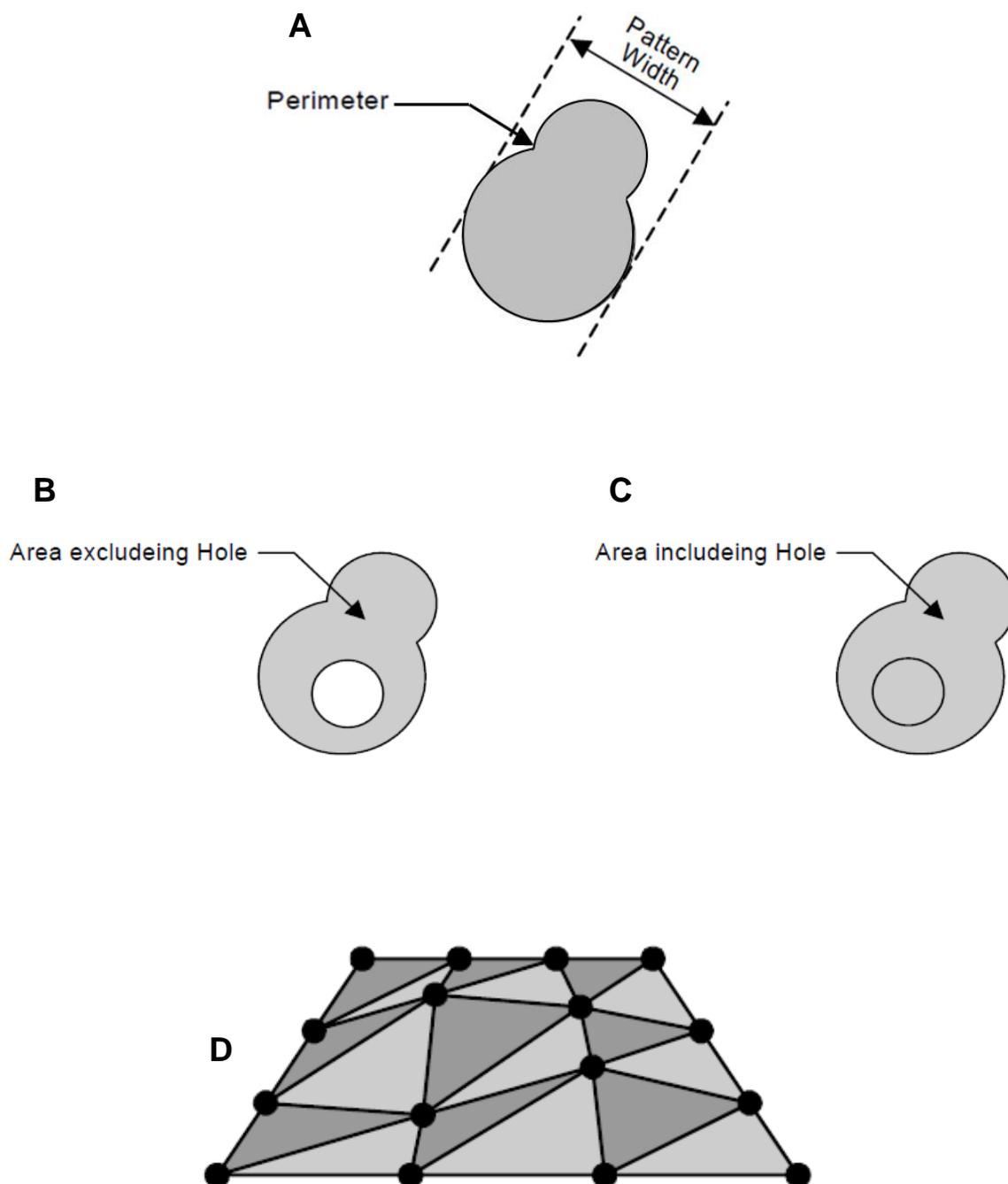
Para avaliar quaisquer efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre eritrócitos, que não necessariamente desencadeiam hemólise, foram analisados dados de topografia de membrana celular obtidos por MFA a fim de fornecer informações de segurança complementares ao teste clássico de atividade hemolítica.

As imagens foram obtidas em modo contato de força constante utilizando “cantilevers” de 200 μm em forma de V (constante de mola própria de $\gg 0.15 \text{ N/m}$ e frequência de ressonância de $\gg 24 \text{ kHz}$), com ponteira piramidal integrada (raio de curvatura $< 20 \text{ nm}$). O movimento do escâner foi de 100 μm nas direções XY e 7 μm na direção Z. Todas as imagens foram adquiridas como 512x512 pixels em uma taxa de escaneamento de 1HZ. As imagens obtidas foram processadas pelo programa Particle Analysis SPM-9600 (Shimadzu, Tóquio, Japão). O processamento consistiu em um nivelamento plano automático Wt de superfície. Cem células individuais de cada tratamento foram manualmente segmentadas utilizando a função do programa “análise de marcação”, seguida pelas medições das células. Os parâmetros selecionados para as medições foram: (1). Perímetro, o qual obtém o comprimento do contorno de uma partícula, e a largura padrão obtida pela medida da distância de uma linha traçada entre duas retas paralelas a uma partícula (FIGURA 3.1.A); (2) Média de Z, obtém o valor médio dos dados de Z provenientes dos pixels que constituem uma partícula; (3) Área excluindo vazios, obtém uma área através da seguinte equação: área excluindo vazios = área por pixel x número de pixels de uma partícula (FIGURA 3.1.B); (4) Área incluindo vazios, obtém uma área através da seguinte equação: área incluindo vazios = área por pixel x (número de partículas + número de pixels no vazio de uma partícula) (FIGURA 3.1.C); (5) Área de superfície, o cálculo utiliza estruturas imaginárias onde, os pontos da estrutura são criados a partir de valores de Z arranjados espacialmente provenientes de pixels que constituem uma partícula. Quadrângulos formados com os pontos das estruturas são divididos em dois para criar triângulos. A somatória das áreas desses triângulos é então calculada (FIGURA 3.1.D); e, (6). Volume, obtido através da seguinte equação: volume = área excluindo vazios x média do valor de Z.

4.4.1 Análise de dados

Os parâmetros processados pelo programa Particle Analysis SPM-9600 (Shimadzu, Japan) foram submetidos à análise de estatística One-way ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de múltiplas comparações Sidak ($p < 0,05$), utilizando o programa estatístico adequado.

Figura 3.1 - A) Perímetro (*perimeter*) e largura padrão (*pattern width*); B) Área excluindo vazios; C) Área incluindo vazios; e, D) Área de superfície. Adaptado de Particle Analysis Software – Instruction Manual (Shimadzu, Japan)



4.5 Efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre náuplios de *Artemia* sp.

Os efeitos da proteína Cry8Ka5 e da proteína Cry1Ac, em concentrações variando de 3,9 a 1000 µg/mL, foram analisados sobre a taxa de sobrevivência de náuplios de *Artemia* sp., como um modelo alternativo proposto para avaliação de citotoxicidade (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2005). Náuplios de *Artemia* sp. (n = 10/amostra/concentração), eclodidos em água do mar artificial (3,5% de salinidade) e com 48 h de vida, foram transferidos para um volume de 3,0 mL de cada amostra em diferentes concentrações. As amostras foram previamente preparadas em água do mar. Foram feitos controles negativos com água do mar (controle negativo). Após 24 h, foram contados os mortos em cada concentração das amostras e os resultados plotados em um gráfico para correlacionar mortalidade x concentração da amostra para cálculo da Concentração Letal para 50% dos indivíduos (CL₅₀) através de análise de Probit (FINNEY, 1970).

4.6 Efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre microrganismos

A fim de investigar os efeitos potenciais das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre microrganismos comuns a microbiota gastrointestinal de mamíferos ou filogeneticamente próximos, foi realizado o ensaio de atividade inibitória do crescimento bacteriano e fúngico em meio líquido.

A pesquisa de atividade inibitória do crescimento de bactérias expostas a concentrações que variaram de 30,6 a 1.000 µg/mL da proteína Cry8Ka5 e da proteína Cry1Ac foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Hissa *et al.* (2008). Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *B. subtilis* e *St. aureus* e as Gram-negativas *E. aerogenes* e *Sa. choleraesuis*. Em condições de esterilidade, a cada poço de placas de microtitulação foram adicionados 100 µL de caldo nutritivo contendo células bacterianas numa concentração de 10⁷ UFC/mL, seguidos de 100 µL de cada amostra estéril (esterilização em filtro Millipore® de 0,22 µm de poro) e dos controles ovalbumina na concentração de 2.000 µg/mL (controle não-Cry), solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (controle negativo) e formol 0,4% (controle positivo). Em seguida, as placas de microtitulação foram submetidas à leitura em comprimento de onda de 600 nm em uma leitora de microplacas (Thermo Plate TP – Reader, São Paulo, Brasil), seguidas de novas leituras a cada 4 h, até um total de 24 h. Para cada amostra foi realizada uma

triplicata contra cada bactéria. A partir das diluições das amostras procedeu-se o cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

O ensaio de inibição do crescimento das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *P. anomala* e *S. cerevisiae* pelas proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, em concentrações que variaram de 30,6 a 1.000 µg/mL, foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2007), com algumas modificações. Nas placas de microtitulação (estéreis), foram adicionados em cada poço 100 µL de caldo BHI, com pH ajustado para 5,0, contendo uma concentração de células leveduriformes correspondente a uma leitura de absorbância de 0,05 (comprimento de onda de 600 nm), seguidos de 100 µL de cada amostra de cry8Ka5 e Cry1Ac estéreis (esterilização em filtro Millipore® de 0,22 µm de poro), dos controles ovalbumina (2000 µg/mL), da solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (controle negativo) e formol 0,4% (controle positivo). Em seguida, as placas foram submetidas à leitura em comprimento de onda de 600 nm em uma leitora de microplacas, seguidas de novas leituras a cada 6 h, até um total de 48 h. Para cada amostra foi realizada uma triplicata contra cada levedura. A partir das diluições das amostras procedeu-se o cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

Foi obtida a quantidade necessária da proteína Cry8Ka5 e da Cry1Ac (100 mg de cada entomotoxina) para os ensaios de cito- e genotoxicidade, para a pesquisa de atividade hemolítica e análise de topografia de membrana celular através de MFA, e para avaliar os efeitos sobre naúplios de *Artemia* sp., e sobre microrganismos, como descritos anteriormente. Detalhes pertinentes ao rendimento da expressão heteróloga e purificação, perfil eletroforético, pureza e confirmação da identidade das proteínas Cry produzidas estão descritos com detalhes no item 5.4 do Capítulo 2.

5.2. Cito- e genotoxicidade das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

Na Tabela 3.1, está mostrado o resultado da avaliação de citotoxicidade em linfócitos humanos periféricos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac através do ensaio do MTT, após 72 h de exposição. Esse teste clássico para avaliação de efeitos citotóxicos não-específicos de compostos naturais e sintéticos revelou que, mesmo na mais elevada concentração testada (1.000 µg/mL), as toxinas não causaram efeitos significativos sobre a viabilidade dos linfócitos, o que resultou numa $CI_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$.

Quanto à avaliação de genotoxicidade as proteínas teste não causaram danos relevantes ao DNA celular, equiparando-se ao resultado do controle negativo, a solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 (FIGURA 3.2). O controle positivo, doxorrubicina 0,6 µM, causou índice de dano ao DNA superior a 200.

5.3 Atividade hemolítica

Na Tabela 3.2, é possível visualizar o resultado da avaliação da presença de atividade hemolítica em suspensões de eritrócitos a 1% de humanos (tipos A, B, AB e O), coelho e ratos tratados com as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac. A proteína Cry8Ka5, igualmente à albumina sérica bovina, não apresentou valores relevantes de atividade hemolítica (< 1%) para todas as suspensões de eritrócitos utilizadas. Por outro lado, a toxina Cry1Ac apresentou valores de atividade hemolítica em todas as suspensões de eritrócitos testadas, que variou de 4,6% em coelho a 16,6% em suspensão de eritrócitos humanos do tipo AB. Dados os baixos percentuais de hemólise detectados, todas as amostras testadas apresentaram valor de $CI_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$.

5.4 MFA

A fim de contribuir com informações adicionais ao teste de atividade hemolítica, foi avaliada a topografia de membrana celular de eritrócitos humanos (tipo O) em sangue total após tratamento de 1 h, a 37 °C, com as proteínas Cry8Ka5, Cry1Ac e albumina sérica bovina na concentração de 1.000 µg/mL (Tabela 3.3). Foram analisados sete parâmetros no total. Quase todos os parâmetros dos eritrócitos tratados com Cry8Ka5 diferiram ($p < 0,05$) daqueles dos eritrócitos dos outros tratamentos, Cry1Ac, albumina e eritrócitos não tratados. A única exceção,

foi o parâmetro Média Z que foi igual ao dos eritrócitos tratados com albumina. A Média Z é o valor médio dos dados de Z provenientes dos pixels que constituem uma partícula (um eritrócito). As demais amostras, Cry1Ac e albumina sérica bovina, causaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos eritrócitos apenas no parâmetro Volume quando comparadas aos eritrócitos sem tratamento. Na Figura 3.3, estão mostradas imagens em 2D e 3D dos eritrócitos tratados com as proteínas controle e sem nenhum tratamento. Em (A) e (B) é possível visualizar as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, respectivamente, sobre a superfície dos eritrócitos ou dispersas no conteúdo celular. Além disso, nenhuma anomalia ou deformação, passíveis de serem vistas nas imagens, é observada nos eritrócitos tratados com as proteínas teste ou quando comparados àqueles não expostos a tratamento.

Tabela 3.1 - Atividade citotóxica em linfócitos humanos periféricos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac avaliada pelo ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol], após 72 h de exposição

Proteínas	*CI₅₀ para linfócitos humanos (µg/mL)
Cry8Ka5	> 1.000
Cry1Ac	> 1.000

*Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% dos linfócitos humanos.

Figura 3.2 - Índice de dano ao DNA de linfócitos humanos expostos por 24 h às proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac. Solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, foi utilizado como controle negativo (-) e doxorrubicina na concentração de 0,6 μ M foi utilizada como controle positivo (+). 1, 2 e 3 correspondem a Cry1Ac nas concentrações de 100, 500 e 1.000 μ g/mL, respectivamente. 4, 5 e 6 correspondem a Cry8Ka5 nas concentrações de 100, 500 e 1.000 μ g/mL, respectivamente. Os dados correspondem à média \pm erro padrão de quatro experimentos independentes. * $p < 0,05$; comparado com o controle negativo por ANOVA/Newman-Keuls

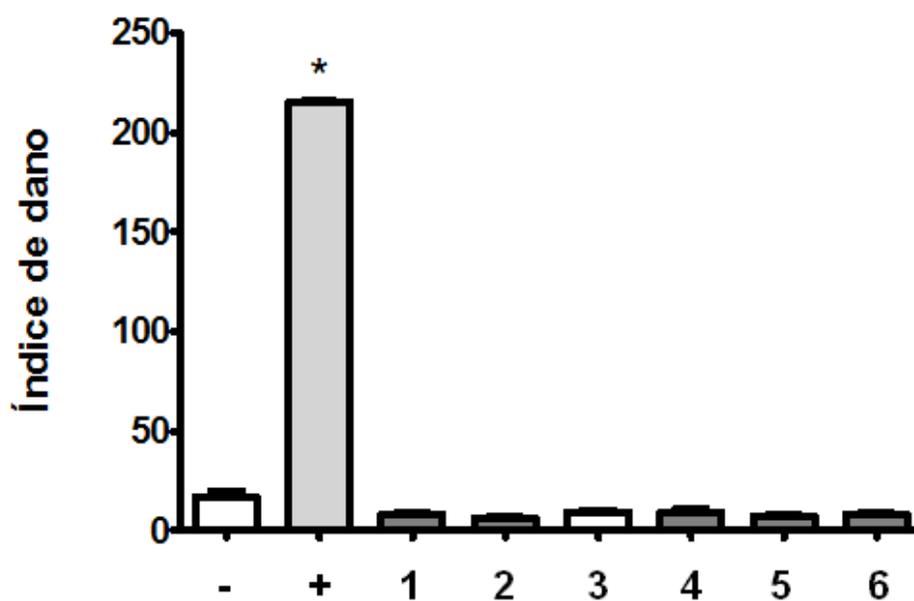


Tabela 3.2 - Presença de atividade hemolítica em suspensões de eritrócitos a 1% de diferentes espécies de mamíferos tratadas com Cry8Ka5, Cry1Ac e demais controle proteicos e não-proteicos *

Eritrócitos (1%)	Água Destilada (controle positivo)		NaCl 0,9% (controle negativo)		Cry8Ka5 1000 µg/mL			Cry1Ac 1000 µg/mL			Albumina Sérica Bovina 1000 µg/mL		
	Abs 540 [#]	% Hem. [†]	Abs 540	% Hem.	Abs 540	% Hem.	CI ₅₀ [‡] µg/mL	Abs 540	% Hem.	CI ₅₀ µg/mL	Abs 540	% Hem.	CI ₅₀ µg/mL
Humano													
A	0,456	100	0,119	0	0,115	0	>1.000	0,173	11,8	>1.000	0,092	0	>1.000
B	0,675	100	0,107	0	0,110	0,7	>1.000	0,140	4,9	>1.000	0,089	0	>1.000
AB	0,648	100	0,112	0	0,106	0	>1.000	0,220	16,6	>1.000	0,089	0	>1.000
O	0,932	100	0,106	0	0,113	0,75	>1.000	0,150	4,7	>1.000	0,087	0	>1.000
Coelho	0,681	100	0,109	0	0,107	0	>1.000	0,141	4,6	>1.000	0,096	0	>1.000
Rato	0,446	100	0,143	0	0,126	0	>1.000	0,205	13,9	>1.000	0,126	0	>1.000

* Os valores de absorvância (Abs) and % de hemólise são médias de triplicatas. Os desvios-padrão foram menores que 20%;

[#] Comprimento de onda (nm) usado para mensurar a liberação da hemoglobina;

[†] Hemólise % = (Abs 540 da amostra – Abs 540 do NaCl 0,9%) X 100/ Abs 540 da água destilada;

[‡] Concentração que causa hemólise de 50% das células.

Tabela 3.3 - Parâmetros unidimensionais, bidimensionais e tridimensionais da morfologia de eritrócitos tratados com Cry8Ka5, Cry1Ac ou albumina sérica bovina, todas na concentração de 1.000 µg/mL, avaliados por microscopia de força atômica *

Parâmetros	Cry8Ka5	Cry1Ac	Albumina sérica bovina	Sem tratamento [†]
Largura padrão (µm)	9,71 ± 1,17 ^{abc}	8,62 ± 0,92	8,44 ± 0,94	8,48 ± 0,82
Perímetro (µm)	33,15 ± 3,59 ^{abc}	28,68 ± 1,86	28,45 ± 2,08	29,42 ± 2,20
Média Z (µm)	0,76 ± 0,08 ^{ac}	1,18 ± 0,14 ^{de}	0,78 ± 0,07 ^f	1,00 ± 0,12
Área excluindo vazios (µm ²)	72,97 ± 12,15 ^{abc}	58,48 ± 7,66	58,36 ± 7,95	61,08 ± 7,92
Área incluindo vazios (µm ²)	73,74 ± 11,45 ^{abc}	58,43 ± 7,66	58,38 ± 7,66	61,16 ± 7,84
Área de superfície (µm ²)	74,96 ± 12,58 ^{abc}	61,83 ± 8,12	59,36 ± 8,01	62,24 ± 8,04
Volume (µm ³)	55,94 ± 10,72 ^{abc}	69,56 ± 14,46 ^{de}	45,66 ± 7,04 ^f	61,45 ± 10,70

* Os valores são média ± desvio-padrão de 100 medições;

[†]Eritrócitos não expostos a tratamento;

^a p < 0,05 (One-way ANOVA) para Cry8Ka5 comparado a Cry1Ac;

^b p < 0,05 (One-way ANOVA) para Cry8Ka5 comparado a Albumina sérica bovina;

^c p < 0,05 (One-way ANOVA) para Cry8Ka5 comparado a Sem tratamento;

^d p < 0,05 (One-way ANOVA) para Cry1Ac comparado a Albumina sérica bovina;

^e p < 0,05 (One-way ANOVA) para Cry1Ac comparado a Sem tratamento;

^f p < 0,05 (One-way ANOVA) para Albumina sérica bovina comparada a Sem tratamento.

Figura 3.3 - Imagens em 2D e 3D (100 x 100 μm) de eritrócitos humano (tipo O) captadas por microscopia de força atômica. (A) Filme de sangue tratado com 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da proteína Cry8Ka5; (B) Filme de sangue tratado com 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da proteína Cry1Ac; (C) Filme de sangue tratado com 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albumina sérica bovina; e, (D) Filme de sangue não-tratado. As setas indicam a presença visível das proteínas Cry nas imagens

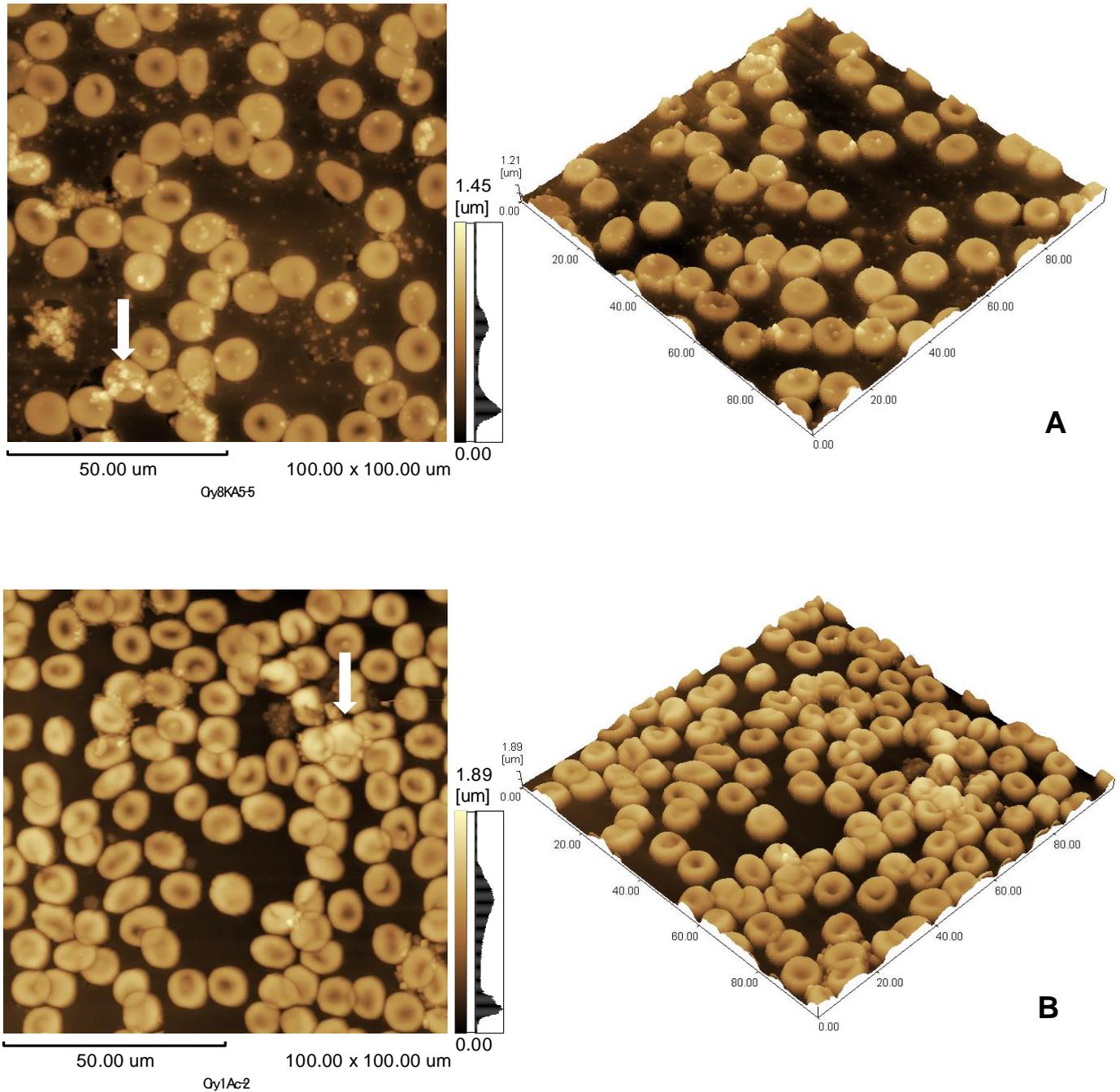
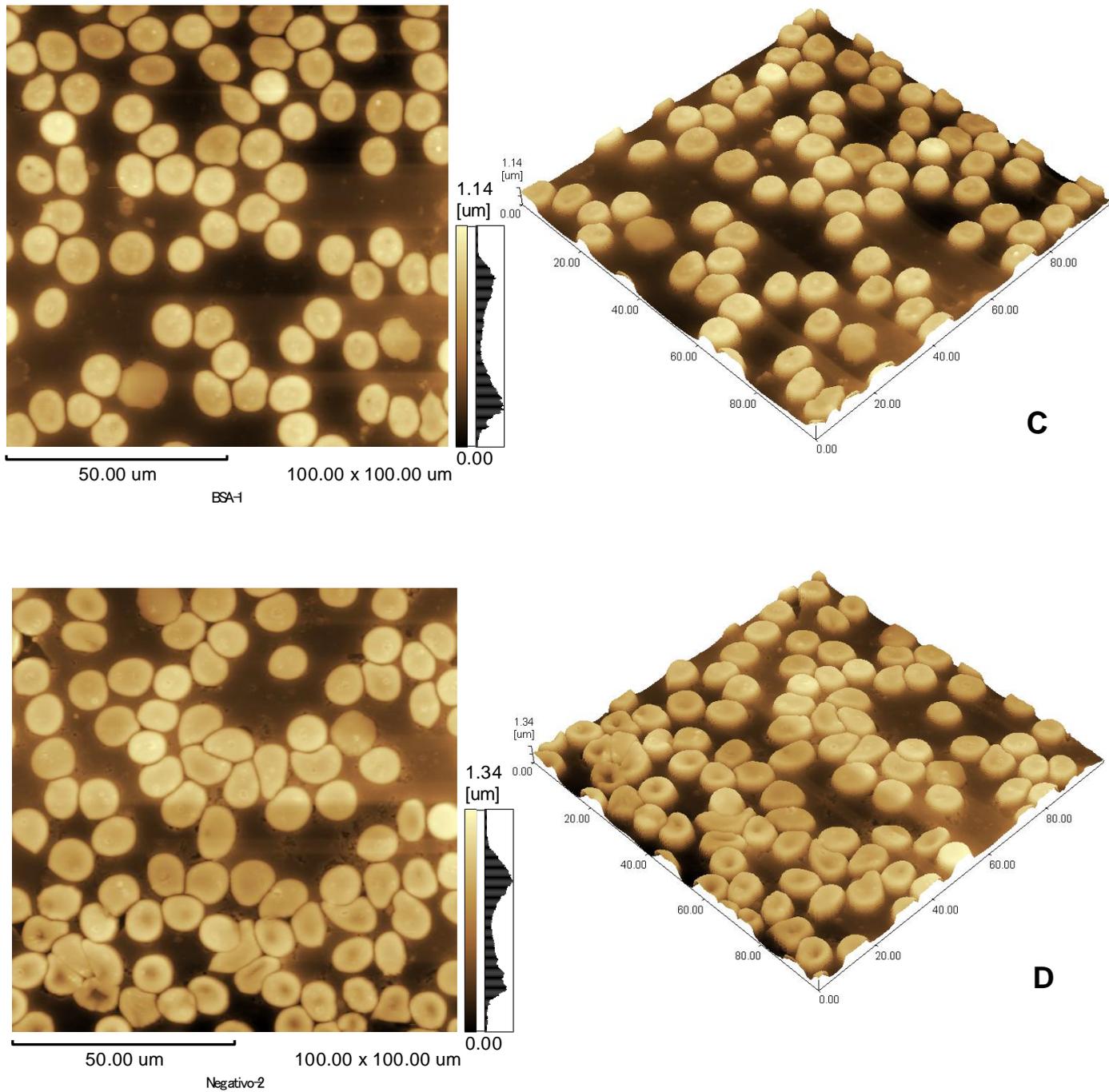


Figura 3.3 (CONTINUAÇÃO) - Imagens em 2D e 3D (100 x 100 μm) de eritrócitos humano (tipo O) captadas por microscopia de força atômica. (A) Filme de sangue tratado com 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da proteína Cry8Ka5; (B) Filme de sangue tratado com 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da proteína Cry1Ac; (C) Filme de sangue tratado com 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albumina sérica bovina; e, (D) Filme de sangue não-tratado. As setas indicam a presença visível das proteínas Cry nas imagens



5.5 Efeitos sobre náuplios de *Artemia* sp.

Para contribuir com informação adicional aos testes de citotoxicidade já apresentados com as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, foi realizada uma avaliação de citotoxicidade alternativa utilizando náuplios de *Artemia* sp. A presença de citotoxicidade baseia-se na ocorrência ou não de morte dos náuplios. Assim, náuplios de *Artemia* sp. com 48 h de vida foram expostos às proteínas Cry8Ka5, Cry1Ac, albumina sérica bovina, em concentrações variadas, e ao controle água do mar artificial por 24 h. Na Tabela 3.4, é possível observar que a proteína Cry8Ka5 apresentou CL_{50} de 755.11 ± 86.88 , única dentre as amostras testadas com CL_{50} inferior a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (maior concentração testada).

5.6. Efeitos sobre Microrganismos

Quatro cepas bacterianas, sendo duas Gram-positivas (*B. subtilis* e *S. aureus*) e duas Gram-negativas (*E. aerogenes* e *S. choleraesuis*), e, ainda, quatro leveduras (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *P. anomala* e *Sacharomicces cerevisiae*) foram expostas por 24 e 48 h, respectivamente, a concentrações que variaram de 30,6 a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ das proteínas Cry8Ka5, Cry1Ac e ovalbumina (a última controle proteico negativo), a solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, (controle negativo) e a formol 0,4% (controle positivo), a fim de avaliar os efeitos da proteína teste sobre microrganismos que compõem a microbiota de mamíferos ou filogeneticamente próximos. No Gráfico 3.1 (A e B), estão apresentadas separadamente as curvas de crescimento de cada uma das cepas bacterianas mencionadas na presença das amostras proteicas na maior concentração testada (1.000 $\mu\text{g/mL}$) e não-proteicas. Para cada bactéria, é possível visualizar uma linearidade do crescimento e uma sobreposição clara ou muito próxima ($p > 0,05$, para cada medição de Abs 600) das curvas referentes a cada amostra testada, com exceção do tratamento com formol em que não houve crescimento. Já no Gráfico 3.1 (C e D), são mostradas separadamente as curvas de crescimento de cada uma das leveduras supracitadas expostas a todas as amostras proteicas e não-proteicas. Da mesma forma, no gráfico de crescimento de cada levedura é vista uma linearidade no crescimento e uma sobreposição evidentes das curvas ($p > 0,05$, para cada medição de Abs 600) referentes a cada amostra testada, com exceção do tratamento com formol em que não houve crescimento.

Por conseguinte, a CIM para as amostras proteicas testadas foi $> 1.000 \mu\text{g/mL}$, quer para as bactérias ou para as leveduras utilizadas.

Tabela 3.4 - Avaliação de citotoxicidade em náuplios de *Artemia* sp. da Cry8Ka5, Cry1Ac e de controles proteicos e não-proteicos após 24 h de exposição

Amostras	Concentrações (µg/mL)	Mortalidade* (%)	CL₅₀[†] (µg/mL)
Cry8Ka5	1.000	66,67	755,11 ± 86,88 (623,93 – 978,60) [#]
	500	26,67	
	250	6,67	
	125	0	
Cry1Ac	1.000	10	> 1.000
Albumina sérica bovina	1.000	3,33	>1.000
Água do mar artificial	-	0	-
Temefós [‡]	-	-	0.16

*Os valores são médias de triplicatas para cada amostra. Os desvios-padrão foram menores que 5% das médias;

[†]Concentração de amostra capaz de matar 50% dos náuplios de *Artemia* sp. (limite de confiança 95%);

[#](limite inferior; limite superior);

[‡]Retirado de Souza *et al.*, (2011).

Gráfico 3.1 - Curvas de crescimento de cepas Gram-positivas, *Bacillus subtilis* (A) e *Staphylococcus aureus* (B), e Gram-negativas, *Enterobacter aerogenes* (C) e *Salmonella choleraesuis* (D), crescidas em caldo nutritivo, contendo as proteínas Cry8Ka5, Cry1Ac e ovalbumina, todas na concentração de 1.000 µg/mL, e os controles não-proteicos tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 e formol 0,4 %. Para todas as leituras de Abs 600, Cry8Ka5 não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$; One-way ANOVA) quando comparada ao controle Cry1Ac, a ovalbumina ou ao tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. Da mesma forma, Cry1Ac não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$; One-way ANOVA) quando comparada ao controle ovalbumina ou ao tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0

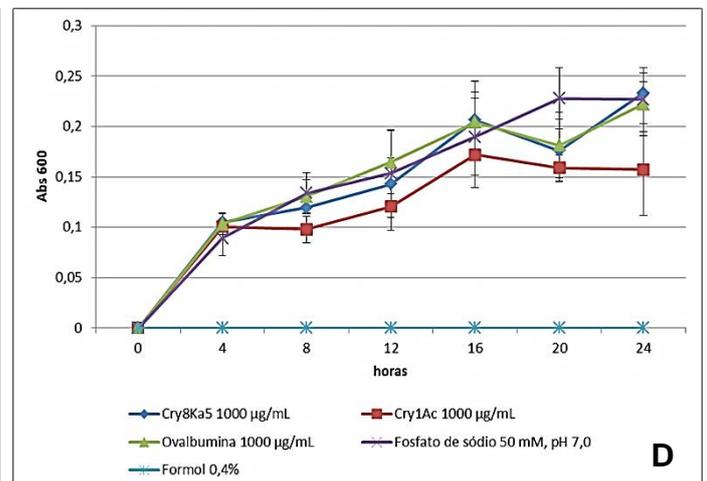
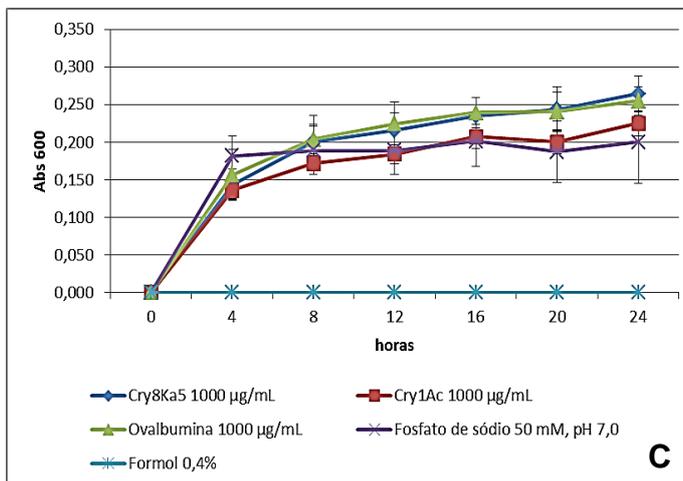
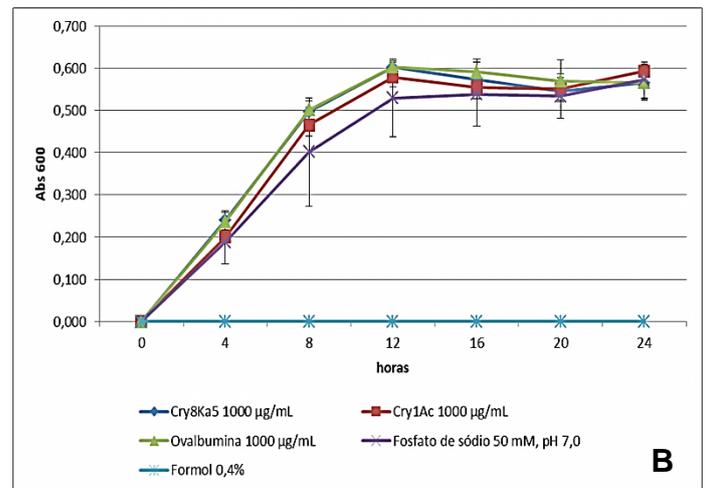
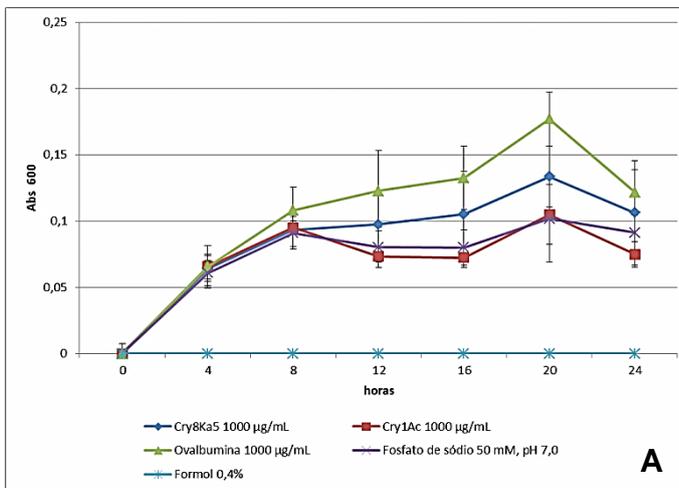
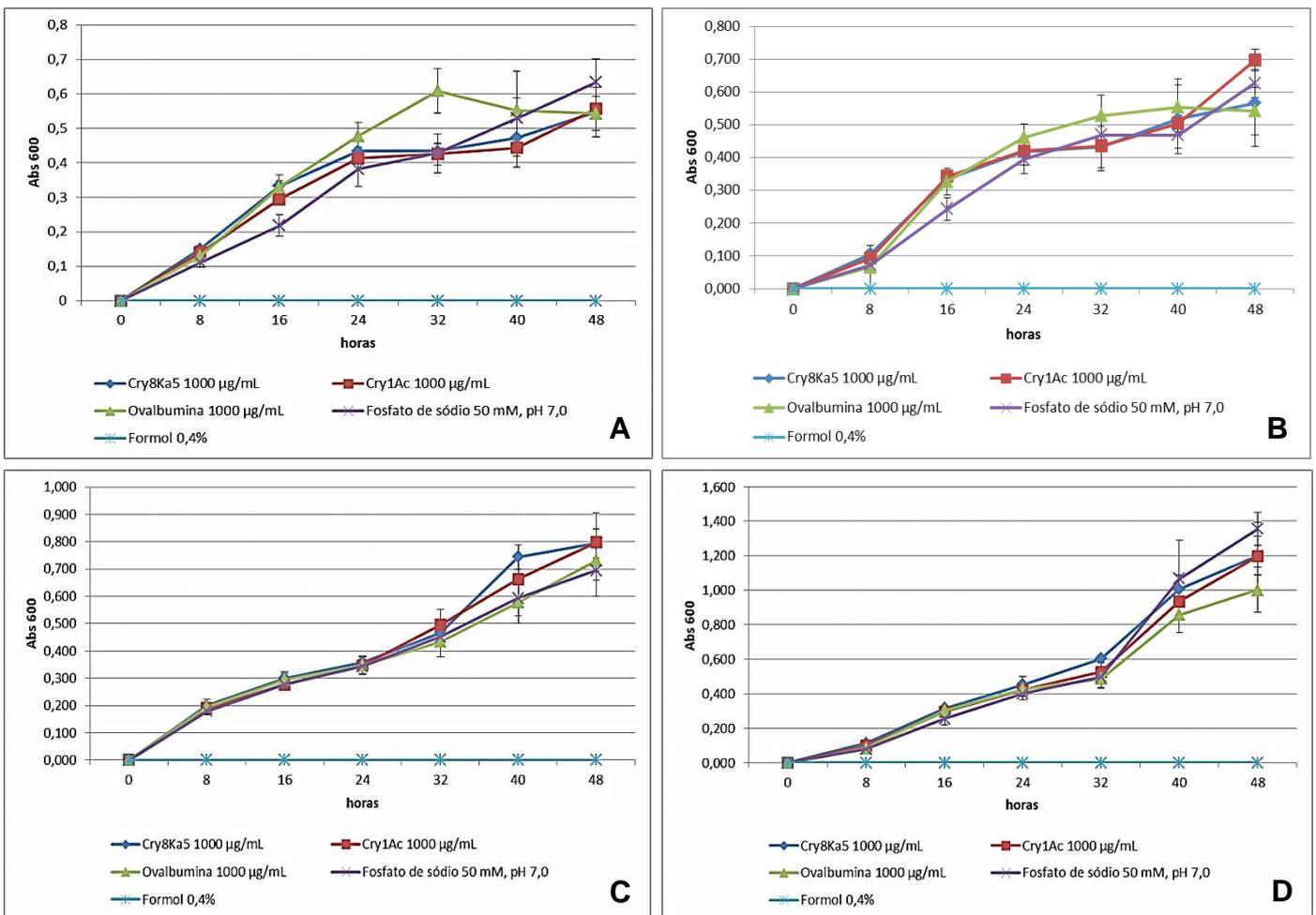


Gráfico 3.1 (CONCLUSÃO) - Curvas de crescimento das leveduras *Candida albicans* (A), *C. tropicalis* (B), *Pichia anomala* (C) e *Sacharomicces cerevisiae* (D) crescidas em caldo BHI, pH 5,0, contendo as proteínas Cry8Ka5, Cry1Ac e ovalbumina, todas na concentração de 1.000 µg/mL, e os controles não-proteicos tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 e formol 0,4 %. Os valores do coeficiente de variação para cada ponto foram $\leq 10\%$. Para todas as leituras de Abs 600, Cry8Ka5 não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$; ANOVA) quando comparada ao controle Cry1Ac, a ovalbumina ou ao tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. Da mesma forma, Cry1Ac não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$; ANOVA) quando comparada ao controle ovalbumina ou ao tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0



6 DISCUSSÃO

Apesar dos testes atuais de avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes incorporadas em culturas de importância econômica, tais como a árvore de decisão proposta pela FAO, OMS e Codex Alimentarius e o teste de duas etapas baseado em pesos de evidência descrito por Delaney *et al.* (2008), mostrarem-se bastante eficientes, vários estudos têm alertado para falhas ou lacunas nesses procedimentos no que concerne a não abrangência de pontos importantes como a avaliação de efeitos sobre células de organismos não-alvo (e.g. células de mamíferos) e sobre a microbiota do organismo consumidor do OGM (YUDINA *et al.*, 2003; REVINA *et al.*, 2005; YUDINA *et al.*, 2007; BONDIZIO *et al.*, 2008). Neste contexto, este capítulo se propôs a avaliar a proteína mutante Cry8Ka5 e a proteína Cry1Ac quanto aos seus efeitos cito- e genotóxicos sobre linfócitos humanos, à presença de danos em eritrócitos de várias espécies de mamíferos, a citotoxicidade sobre náuplios de *Artemia* sp. e aos efeitos antimicrobianos sobre microrganismos. Finalmente, se propôs a avaliar adequabilidade desse tipo de abordagem complementar para a avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes.

Os testes para avaliação dos efeitos cito- e genotóxicos em linfócitos humanos periféricos saudáveis têm sido extensivamente utilizados para avaliação de segurança de compostos naturais e sintéticos presentes em elevadas concentrações em alimentos e no meio ambiente como contaminantes ou, ainda, na avaliação de especificidade de novas moléculas com potencial anticâncer (LIMA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2008a,b; MILITÃO *et al.*, 2012). Mesmo na concentração mais elevada testada (1000 µg/mL), as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac não apresentaram quaisquer efeitos citotóxicos sobre os linfócitos. Da mesma forma, essas proteínas na concentração de 1.000 µg/mL não causaram danos ao DNA dos linfócitos, mostrando sua ausência de efeitos genotóxicos de acordo com o método usado. SHIMADA *et al.* (2003) e BONDIZIO *et al.* (2008) também não detectaram efeitos citotóxicos da toxina Cry1Ab em cultura de hepatócitos bovinos e em cultura de células de epitélio de rúmen de ovelha, respectivamente. Outras toxinas Cry, como Cry4a e Cry11A, tampouco apresentaram efeitos citotóxicos contra uma linhagem de células humanas, a linhagem de carcinoma de mama MCF-7 (TEIXEIRA CORRÊA *et al.*, 2012).

Quanto à avaliação de genotoxicidade, são extremamente raros os estudos abordando os efeitos de proteínas Cry sobre o material genético de células saudáveis. No entanto, Grisolia *et al.* (2009) relataram os efeitos genotóxicos em larvas e embriões de peixe-zebra, um modelo para esse tipo de estudo, na presença de doses moderadas (25 a 150 µg/mL)

das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A isoladas ou em combinações. Contudo, o mesmo estudo ressalta que esse resultado não pode ser generalizado para todas as proteínas e que mecanismos particulares a cada proteína estão relacionados a esse efeito. A ausência de efeitos cito- e genotóxicos em linfócitos humanos das proteínas Cry testadas pode ser razoavelmente explicada pela ausência de sítios receptores para ligação efetiva dessas proteínas na superfície desse tipo de célula, ao contrário do que é relatado para células que compõem o intestino de determinadas classes de insetos (BRAVO *et al.*, 2007). Vale ressaltar ainda, que a avaliação de cito- e genotoxicidade em linfócitos humanos com proteínas Cry realizada neste estudo é o primeiro exemplo da utilização desses testes para avaliação de biossegurança de toxinas *Bt*.

O efeito das toxinas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre a integridade da membrana celular de eritrócitos de humanos (tipos A, B, AB e O), coelho e rato também foram investigados. A razão para isso é que os eritrócitos são as células mais abundantes no organismo de várias espécies de animais do Filo Chordata e, ainda, são o alvo de várias moléculas citotóxicas, incluindo proteínas, chamadas de hemolisinas. Dessa forma, dois testes foram realizados, o teste clássico de presença de atividade hemolítica em suspensão de eritrócitos (1%) e a análise de topografia de membrana celular de eritrócitos em sangue total humano (tipo O). Na avaliação de presença de atividade hemolítica, todas as suspensões de eritrócitos de diferentes origens não apresentaram percentual de hemólise > 1 % quando expostos a concentração mais elevada de Cry8Ka5 (1000 µg/mL). Já a proteína Cry1Ac apresentou valores percentuais de atividade hemolítica na concentração mais elevada (1.000 µg/mL) e para as diferentes amostras de eritrócitos que variou de 4,6 a 16,6%. Contudo, de acordo com os critérios de Bernheimer (1988), valores < 20% devem ser considerados irrelevantes dado a propensão aumentada à hemólise inerente aos eritrócitos de determinadas espécies animais.

Apesar do ensaio de atividade hemolítica fornecer resultados valiosos num contexto de avaliação de biossegurança alimentar de uma nova proteína, nem todas as substâncias danosas às células provocam injúrias severas à membrana celular que culminam em rompimento da célula e liberação de hemoglobina. Muitas vezes, os danos à membrana podem ser sutis devido à baixa concentração da molécula potencialmente citotóxica ou por conta de baixa afinidade com os receptores de membrana. Dessa forma, tais circunstâncias podem ocasionar uma perda discreta de conteúdo celular ou no aumento de volume por influxo lento de líquido externo, em ambos os casos, causando deformidades na célula. Portanto, a análise topografia de membrana celular através de MFA pode contribuir com informações adicionais sobre a integridade da membrana dos eritrócitos expostos as proteínas

Cry. No caso da exposição dos eritrócitos humanos do tipo O à proteína Cry8Ka5 quando comparada aos eritrócitos nativos (sem tratamento), foram observadas diferenças nos sete parâmetros analisados. Apesar de essas diferenças terem sido significativas do ponto de vista estatístico, as mudanças promovidas pela Cry8Ka5 não foram tão acentuadas, sendo os valores médios dos parâmetros desse tratamento somente 0,1 a 0,24 vezes maiores ou menores do que os valores do grupo não tratado. A importância da magnitude dessa diferença detectada não é fácil de explicar, mas é certo que não foi capaz de promover hemólise das células, mesmo numa concentração pouco provável de uma célula não-alvo ser exposta. Provavelmente, a realização de uma nova exposição dos eritrócitos a Cry8Ka5 em concentrações menores e por períodos mais longos (2 a 4 horas) poderá fornecer indícios sobre a relevância das diferenças detectadas. Outro ponto que merece destaque, é que todas as amostras diferiram do grupo não tratado no parâmetro Volume. Talvez o parâmetro mais importante, pois fornece sinais claros de um provável influxo de líquido para o interior celular dada a condição hipotônica do meio em que se encontravam. Dependendo do período de exposição ao tratamento, isso poderia acarretar lise celular. Da mesma forma, a realização de um novo experimento com todas as amostras e com um maior tempo de exposição pudesse esclarecer mais esse ponto. A possibilidade de utilização de análises de topografia de membrana celular via MFA foi, inicialmente, suscitada por Brand *et al.* (2006), que mostraram alterações acentuadas nos referidos parâmetros da membrana de eritrócitos causadas pelo tratamento com dermaseptinas, peptídeos citotóxicos isolados da pele da rã *Phyllomedusa hypochondrialis*. Outro fato interessante, é que é possível visualizar claramente a partir das imagens em 2D e 3D um acúmulo das proteínas Cry, especialmente da Cry8Ka5, sobre a superfície dos eritrócitos. Se existiu alguma interação das proteínas Cry com receptores de membrana, essa não foi capaz de desencadear seus efeitos clássicos de formação de poro na mesma magnitude que acontece em células do intestino dos insetos-alvo. De uma forma geral, as proteínas testadas, incluindo a proteína Cry8Ka5, não causaram danos severos aos eritrócitos, seja a partir de hemólise ou alterações acentuadas na membrana.

Ainda no contexto da avaliação de citotoxicidade das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, foi avaliada a taxa de sobrevivência do microcústáceo modelo *Artemia* sp. quando exposto às amostras experimentais. O gênero *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca), principalmente as espécies *Artemia salina* e *A. franciscana*, é utilizado em uma ampla gama de ensaios toxicológicos e de investigação. Dentre esses, é utilizado na triagem de compostos bioativos em produtos naturais (COLOMBO *et al.*, 2001; FAVILLA *et al.*, 2006), detecção de compostos tóxicos de cianobactérias e algas na água (CALDWELL; BENTLEY; OLIVE,

2003; MOHAMED, 2007), detecção de produtos químicos decorrentes da ação humana no ambiente (SANCHEZ-FORTUN *et al.*, 1997; PODIMATA; KOUTSERIS; TSIROPOULOS, 2004), e investigações sobre processos bioquímicos mediados por respostas tóxicas agudas (BARAHONA; SANCHEZ-FORTUN, 1999; ACEY *et al.*, 2002). Assim, por ser um teste de baixo custo, rápido, bastante informativo e que não traz à tona questões éticas, pois não inflige sofrimento a mamíferos, o mesmo foi realizado neste estudo. A proteína Cry1Ac apresentou CL₅₀ bastante elevada (> 1000 µg/mL), enquanto a Cry8Ka5 apresentou valor inferior (755.11 µg/mL). Contudo, se considerarmos a CL₅₀ da Cry8Ka5 para o seu-alvo principal, o bicudo-do-algodoeiro, (2,83 µg/mL, segundo OLIVEIRA *et al.*, 2011) chegaremos à conclusão que o valor encontrado contra *Artemia* é quase 270 vezes superior, o que só reforça a especificidade dessa proteína. Além disso, dificilmente um organismo não-alvo da Cry8Ka5 será exposto a uma concentração tão elevada, uma vez que os níveis de expressão do gene exógeno em uma planta transgênica de algodão perfazem 0,01-0,1% da proteína total em condições ótimas (HASHIMOTO *et al.*, 1999), o que resultaria numa concentração de 23-230 µg/mg, levando em conta o teor de proteína do caroço que é 23% (ROGÉRIO *et al.*, 2003). Ainda assim, essa concentração é de 3,2 a 32 vezes menor do que a CL₅₀ detectada no teste de citotoxicidade contra *Artemia*. Isso, sem levar em consideração os menores teores de proteína de outras partes da planta de algodão, como folhas, pluma e caule. Portanto, os resultados do teste de citotoxicidade com *Artemia* sp. corroboraram com os resultados dos demais testes realizados com a Cry8Ka5, mas apresentou uma maior sensibilidade a possíveis efeitos tóxicos dessa molécula. Isso sugere a realização de testes posteriores com maior número de moléculas Cry diferentes a fim de confirmar o potencial desse microcrustáceo como um biomarcador para avaliação de biossegurança alimentar e ambiental de novas proteínas de *Bt*.

Um dos maiores questionamentos sobre a eficiência dos atuais métodos de avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes é a ausência de testes que avaliem os impactos dessas moléculas sobre a microbiota do trato gastrointestinal de mamíferos (BONDÍZIO *et al.*, 2008). Além disso, reside também uma preocupação sobre os efeitos dessas proteínas em microrganismos do solo e do ambiente em geral, dado a sua importância para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas (PRIHODA; COATS, 2008; PRIHODA; COATS, 2010). Neste contexto, foram selecionadas quatro bactérias e quatro leveduras comuns na microbiota humana ou animal ou filogeneticamente próximas para serem utilizadas na avaliação dos efeitos antimicrobianos das proteínas experimentais. Tanto a proteína Cry8Ka5 quanto a Cry1Ac não apresentaram inibição do crescimento em meio

líquido das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ou das leveduras na concentração de 1.000 µg/mL. De fato, a maior parte dos relatos de atividade antibacteriana de proteínas de *Bt* está relacionada às classes de proteínas Cry com atividade mosquitocida, ou seja, proteínas Cry com atividade contra dípteros (YUDINA *et al.*, 2003; REVINA *et al.*, 2005), o que não é o caso da proteínas Cry em estudo. Contudo, para algumas toxinas Cry ativas contra outras classes de insetos, tais como Cry1Ab, Cry1D e Cry3Aa, foram relatados efeitos antimicrobianos contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas, com CIMs variando de 45-150 µg/mL e estando seus mecanismos de ação estreitamente relacionados à composição da parede celular como a presença de ácido teicóico e *N*-acetilgalactosamina (YUDINA *et al.*, 2007). Portanto, a ausência de atividade antibacteriana das toxinas Cry ensaiadas pode estar relacionada à composição da parede celular das cepas utilizadas ou mesmo às condições experimentais que não propiciaram a ação dessas proteínas. Assim, testes posteriores com um maior número de cepas bacterianas e em diferentes condições de experimentação poderão oferecer maior certeza sobre a ausência de efeitos antibacterianos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac. Quanto à ausência de atividade antifúngica das proteínas Cry, a composição da parede celular de fungos, formada essencialmente por quitina e sem sítios de ligação específicos para essas proteínas pode explicar o resultado negativo obtido contra os fungos.. Certamente, a ausência de efeitos cito- e genotóxicos em células de mamíferos, bem como de efeitos negativos sobre o crescimento de microrganismos são características extremamente positivas no contexto de avaliação de biossegurança alimentar das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac. Contudo, a fim de agregar mais valor a esses resultados, seria interessante que se repetisse todos os ensaios realizados com as modificações já sugeridas no decorrer desta seção e, ainda, acrescentasse aos mesmos, amostras de peptídeos das proteínas Cry obtidos a partir de digestão sequencial *in vitro*, como será mostrado no próximo capítulo. Isso aproximaria os resultados obtidos de uma condição mais próxima da realidade, uma vez que as células de humanos e animais, bem como a microbiota intestinal, estão expostas em maior proporção aos peptídeos oriundos da digestão proteica do que das proteínas íntegras.

7 CONCLUSÃO

As conclusões deste capítulo são:

- A proteína mutante Cry8Ka5 e a proteína Cry1Ac não apresentaram efeitos cito- e genotóxicos em linfócitos humanos periféricos, mesmo quando exposta a uma alta concentração dessas moléculas.
- As toxinas Cry8Ka5 e Cry1Ac não causaram hemólise de eritrócitos de humanos, coelho e rato. No entanto, a Cry8ka5 causou alterações na topografia da membrana celular de eritrócitos humanos tipo O, via MFA. Novos testes em concentrações menores (mais próximas de situações reais) e com maiores tempos de exposição devem ser realizados para avaliar a relevância das alterações detectadas.
- A proteína Cry8Ka5 apresentou citotoxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia* sp., mas apenas em doses elevadas ($CL_{50} > 700 \mu\text{g/mL}$), enquanto a Cry1Ac não apresentou citotoxicidade mesmo na maior concentração testada ($1000 \mu\text{g/mL}$).
- Cry8Ka5 e Cry1Ac também não inibiram o crescimento de quatro cepas bacterianas, duas Gram-positivas e duas Gram-negativas, e de quatro leveduras, mesmo em elevadas concentrações.
- Em linhas gerais, as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac não apresentaram cito- ou genotoxicidade considerável, mesmo quando testadas em altas doses e em diferentes metodologias, além de não apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.
- Por fim, os métodos de avaliação propostos para verificar os efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre células de organismos não-alvo, neste caso de mamíferos, bem como sobre microrganismos utilizados como modelo para a microbiota intestinal, forneceram informações valiosas à avaliação de biossegurança alimentar dessas proteínas e, portanto, são passíveis de serem utilizados para testes com novas proteínas. Além disso, esses resultados agregam características positivas à entomotoxina Cry8Ka5 que aliados aos dados do teste de biossegurança alimentar de duas etapas reforçam o potencial da mesma para o desenvolvimento de plantas de algodão *Bt* resistentes ao bicudo-do-algodoeiro.

Capítulo 4

Efeitos das Proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac sobre o Perfil de Expressão Gênica de Células Humanas de Intestino Caco-2: Uma Abordagem Toxicogenômica Comparativa



1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA/JUSTIFICATIVA

No final dos anos de 1990, o termo toxicogenômica surgiu para nomear o uso da tecnologia dos microarranjos de DNA aplicada à identificação de genes relevantes relacionados com respostas toxicológicas e potencialmente úteis como biomarcadores de toxicidade (NUWAYSIR *et al.*, 1999). Através dos microarranjos de DNA é possível a comparação quantitativa simultânea de milhares de genes individuais em amostras biológicas. Isso, por sua vez, é uma ferramenta poderosa que pode facilitar a pesquisa, a avaliação e/ou predição de potenciais interações perigosas após a exposição de organismos ou linhagens celulares a misturas ou substâncias isoladas. Portanto, análises de mudanças no perfil de expressão gênica podem fornecer maior sensibilidade, rapidez e apontar novos marcadores de toxicidade, que dificilmente são alcançados através dos métodos toxicológicos convencionais (MARCHANT, 2002).

Concomitante aos primeiros passos da toxicogenômica dava-se também o estabelecimento das primeiras plantas GM no mercado. Naquele momento, os microarranjos de DNA já começavam a ser cogitados como ferramentas promissoras para a avaliação de riscos de plantas transgênicas. No entanto, essa tecnologia ainda apresentava muitas limitações, especialmente, no que diz respeito à reprodutibilidade, velocidade, custo e sensibilidade (VAN HAL *et al.*, 2000). O aperfeiçoamento das técnicas e o aumento da acessibilidade a essa tecnologia permitiram que muitos estudos fossem realizados, utilizando análises de expressão gênica como ferramentas para avaliar os efeitos de componentes alimentares naturais e sintéticos, bem como de contaminantes como pesticidas, sobre linhagens de células humanas e animais (MANDIMIKA *et al.*, 2007a,b; MANDIMIKA *et al.*, 2008; KATIKA *et al.*, 2011; KATIKA *et al.*, 2012; VAN KOL *et al.*, 2012). Pode ser citada como exemplo, a análise do perfil de expressão gênica da linhagem celular de carcinoma de cólon humano Caco-2, após exposição a diferentes glicoalcalóides da batata de forma isolada ou em misturas, onde foram detectados efeitos negativos sobre vários processos celulares, tais como biossíntese do colesterol, sinalização do hormônio do crescimento, metabolismo de lipídeos e aminoácidos etc, bem como contribuíram para a elucidação dos mecanismos de ação dessas moléculas (MANDIMIKA *et al.*, 2007a,b). Apesar de todas as informações obtidas nesse tipo de abordagem genômica, não há estudos usando dados de expressão gênica oriundos de linhagens celulares de humanos ou animais tratadas com proteínas recombinantes num contexto de avaliação de biossegurança alimentar de plantas GM.

Genes *cry* de *Bt* têm sido ferramenta valiosa para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos (TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2011). No entanto, importantes insetos-praga permanecem sem qualquer forma eficaz de controle. Dentre eles destaca-se o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*), coleóptero que é o principal problema enfrentado pela cultura do algodão no Brasil, pois os cultivares de algodão *Bt* disponíveis para comercialização são eficazes apenas contra insetos lepidópteros. Esses cultivares expressam a toxina Cry1Ac como única proteína inseticida ou combinada a Cry1F ou Cry2Ab2 em arranjos piramidizados (CTNBIO, 2012). Portanto, o desenvolvimento de um cultivar de algodão resistente ao bicudo é urgentemente necessário (NAKASU *et al.*, 2010). Neste contexto, o gene *cry8Ka1* foi clonado a partir da cepa brasileira S811 de *Bt*, ativa especificamente contra coleópteros (MARTINS *et al.*, 2007). Evolução molecular dirigida *in vitro*, utilizando a técnica de “DNA shuffling” aliada à seleção de variantes por “phage display”, foi aplicada para melhorar a atividade inseticida da proteína Cry8Ka1. A mutante Cry8Ka5 exibiu a maior atividade contra larvas de *A. grandis*, sendo 4 vezes mais potente do que a proteína parental (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Dada a sua atividade promissora, essa entomotoxina mutante tem sido utilizada nos programas de melhoramento de algodão no Brasil. Como Cry8Ka5 é uma candidata em potencial para o desenvolvimento de um algodão *Bt*, esse biopesticida deve ser rigorosamente testado quanto a sua biossegurança alimentar a fim de detectar potenciais efeitos alérgicos, tóxicos e/ou antimetabólicos, como tem sido conduzido com outras proteínas Cry, tais como a Cry1Ac (DELANEY *et al.*, 2008).

Uma estratégia que tem sido utilizada para avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes é um teste de duas etapas sugerido por Delaney *et al.* (2008), que se baseia em pesos de evidência e que leva em conta a totalidade dos dados de uma forma holística. Sucintamente, a Etapa I trata da identificação de perigos potenciais através de informações sobre a proteína em estudo (história de uso seguro, modo de ação e análises de bioinformática) e uma avaliação de certas propriedades físicas da mesma (resistência ou sensibilidade a enzimas digestivas, à temperatura elevada etc). Por sua vez, a Etapa II lida com a caracterização do perigo com foco em testes toxicológicos clássicos e outros testes baseados em hipóteses. Embora essa abordagem de avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes tenha se mostrado bastante eficiente, não se pode negligenciar a existência de tecnologias emergentes que podem contribuir com dados adicionais para a avaliação da segurança de consumo dessas moléculas, especialmente aquelas sem histórico de consumo por seres humanos ou animais. À luz disso, uma abordagem toxicogenômica comparativa, que envolvesse dados de transcriptômica provenientes de células tratadas com

uma proteína Cry teste vs. células tratadas com controles apropriados poderia acrescentar informações valiosas sobre a biossegurança alimentar dessa nova molécula.

Assim, foi proposto um fluxograma de atividades a fim de guiar uma análise toxicogenômica comparativa com as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, utilizando vários controles proteicos e não-proteicos, e que conduzisse a equipe a resultados passíveis de conclusões decisivas sobre a existência de efeitos potencialmente perigosos da proteína teste (FIGURA 4.1). Além disso, as atividades foram propostas de forma a aproximarem-se o máximo possível de uma situação real de exposição de humanos a uma nova proteína. Em linhas gerais, as proteínas teste foram submetidas à digestão sequencial *in vitro* por pepsina e tripsina, consecutivamente, sendo a degradação das proteínas monitorada por CL-EM (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas). Em seguida, as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac e suas respectivas amostras de peptídeos, denominada Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep, foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade para culturas de células humanas MCF-7 (carcinoma de mama) e Caco-2 (carcinoma de cólon) para definição de uma dose subcitotóxica. Subsequentemente, estas células foram expostas a concentrações subcitotóxicas (viabilidade celular $\geq 80\%$) das proteína íntegras e das amostras de peptídeos, seguidas por isolamento de RNA e análise da expressão de genes utilizando microarranjos de DNA. Ao final, os resultados foram avaliados de acordo com a última etapa do fluxograma de atividades.

Por fim, a utilização bem sucedida da toxicogenômica para avaliar potenciais efeitos deletérios de substâncias presentes em alimentos sobre células humanas, aliada ao grande número de relatos científicos sobre a biossegurança alimentar das proteínas Cry de *Bt* forneceram os subsídios para elaboração das seguintes hipóteses:

A abordagem toxicogenômica comparativa empregada, utilizando várias proteínas como controle e um desenho experimental robusto, é adequada para contribuir com informações adicionais sobre a biossegurança alimentar das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este capítulo objetivou avaliar os efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac e de um “pool” de peptídeos de cada uma (Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep, respectivamente), obtidos por digestão sequencial *in vitro*, sobre o perfil de expressão gênica de células de carcinoma de mama MCF-7 e de carcinoma de cólon Caco-2, ambas humanas, e, a partir disso, avaliar adequabilidade desse tipo de abordagem toxicogenômica comparativa para a avaliação de biossegurança alimentar de proteínas recombinantes.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter uma amostra (“pool”) de peptídeos a partir da proteína Cry8Ka5 e da proteína Cry1Ac a partir de digestão sequencial *in vitro*;
- Determinar uma dose subcitotóxica ($\geq 80\%$ viabilidade celular) das proteínas teste Cry8Ka5 e Cry1Ac, das amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e de outras proteínas/peptídeos controle (PHA-E, SBTX e microcistina-LR) através do teste de viabilidade celular com as linhagens de células MCF-7 e Caco-2, ambas indiferenciadas;
- Expor células MCF-7 (50-70% de confluência), indiferenciadas, cultivadas em placas de 6 poços, a doses subcitotóxicas das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, das amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e das proteínas controle por 24 h. Posteriormente, proceder com o isolamento, purificação e quantificação da concentração e pureza do RNA total das células MCF-7;
- Expor células Caco-2 (21 dias de idade), diferenciadas, cultivadas em placas Transwell[®] de 6 poços, a doses subcitotóxicas das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, das amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e das proteínas controle por 24 h. Posteriormente, proceder com o isolamento, purificação e quantificação da concentração e pureza do RNA total das células Caco-2;
- Conduzir o RNA total das células MCF-7 e Caco-2 tratadas com as amostras de proteínas para hibridização e leitura dos microarranjos de DNA de genoma total;

- Analisar os dados provenientes das leituras dos microarranjos de DNA de ambas as linhagens celulares, utilizando programas para controle de qualidade dos dados, normalização, estabelecimento de diferenças estatísticas, agrupamento e hierarquização dos genes;
- Utilizar programas e bases de dados específicos para fazer a interpretação biológica dos dados oriundos dos microarranjos de DNA;
- Avaliar a contribuição da abordagem toxicogenômica comparativa empregada, utilizando dados de expressão gênica de linhagens celulares humanas tratadas com as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac e com suas amostras de peptídeos no contexto da avaliação da biossegurança alimentar de uma nova proteína para desenvolvimento de plantas transgênicas.

3 MATERIAIS

3.1 Reagentes biológicos

3.1.1 Linhagens celulares e manutenção das culturas

As células de carcinoma de mama MCF-7 e as células de carcinoma de cólon Caco-2, ambas originadas de humanos, foram obtidas da ATCC (Manassas, VA, EUA). As células foram cultivadas rotineiramente em frascos de cultura de 75 cm², contendo o meio de cultura DMEM (Lonza, Verviers, Bélgica), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de vitelo (FCS, Gibco, Carlsbad, EUA) e 0,6% (v/v) de penicilina-estreptomicina (10.000 unidades de penicilina e estreptomicina 10 mg/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA). Para células Caco-2 foi também adicionado ao meio 0,1 mM de aminoácidos não essenciais 100x (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mi, EUA). As culturas foram mantidas em estufas incubadoras a 37 °C, em ar com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa.

3.2 Reagentes químicos e outros materiais

3.2.1 Proteínas

A proteína recombinante Cry8Ka1 (~70 kDa), a toxina *Bt* parental da Cry8Ka5, foi cedida pela Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, da Embrapa Cenargen (Brasília, DF), e

produzida de acordo com o protocolo detalhadamente descrito por Oliveira *et al.* (2011). Da mesma forma, a proteína SBTX (~44 kDa na forma nativa), uma proteína letal para camundongos ($DL_{50} 5.6 \pm 0.1$ mg/Kg), foi cedida pela Dra. Ilka Maria Vasconcelos, da Universidade Federal do Ceará, e obtida de acordo com o protocolo de isolamento e purificação descrito por Vasconcelos *et al.* (2008). A lectina de *Phaseolus vulgaris*, PHA-E (~30 kDa na forma nativa), e o peptídeo cíclico colistina (~1 kDa) foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA) sob os códigos L8629 e 27655, respectivamente. O peptídeo microcistina-LR, uma neurotoxina de cianobactéria, foi adquirido comercialmente da Enzo Life Sciences (Nova Iorque, NY, EUA) sob o código ALX-350-012.

3.2.2 Reagentes e materiais para expressão, purificação e quantificação das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

Ampicilina, IPTG, lisozima, coomassie brilliant blue G-250, BSA e membrana de diálise com poro de 6-8 kDa foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA). A coluna de ácido nitrilotriacético-níquel foi comprada da QIAGEN (Venlo, Holanda), enquanto o imidazol e o DTT foram adquiridos da GE Healthcare (Uppsala, Suécia).

3.2.3 Reagentes e materiais para eletroforese e sequenciamento

Acrilamida, coomassie brilliant blue R-250, SDS, TEMED, trizma-base, metilenobisacrilamida, 2-mercaptoetanol e marcadores de massa molecular foram comprados da AMRESCO Inc. (Solon, OH, EUA). Membranas de PVDF foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA).

3.2.4 Reagentes e materiais para digestão in vitro e produção das amostras de peptídeos

Membrana de diálise com poro de 12 kDa foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA), enquanto as membranas de diálises com poro de 100-500 Da foram adquiridas da Fischer Scientific (Hampton, Reino Unido). Pepsina da mucosa gástrica de porco (P6887), tripsina de pâncreas bovino (T8003) e inibidor de tripsina de soja (SBTI) (T9003) foram comprados da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA).

3.2.5 Materiais para testes de viabilidade celular e exposição das células MCF-7 e Caco-2 às proteínas

O kit ATPlite™ para mensuração da viabilidade celular foi adquirido comercialmente da PerkinElmer (Groningen, Holanda). Os frascos para cultura de células de 175 cm² foram adquiridos da Corning® (Nova Iorque, NY, EUA), enquanto as placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano, placas de seis poços e placas Transwell® de seis poços e suporte permeável com poro de 0,4 µm foram adquiridas da Costar® (Washington, DC, EUA).

3.2.6 Materiais para isolamento e purificação de RNA total

Para isolamento e purificação de RNA foram utilizados os kits RNase-Free DNase Set (50) para digestão de DNA e RNeasy Mini Kit (250) para obtenção do RNA total foram adquiridos comercialmente da Qiagen (Westburg bv. Leusden, Holanda).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.3 Considerações sobre Biossegurança

A legislação e os procedimentos gerais relativos ao manuseio e armazenamento de material oriundo da tecnologia do DNA recombinante foram anteriormente descritos no Capítulo 2. As considerações pertinentes a este capítulo serão apresentadas a seguir.

As etapas de obtenção das proteínas Cry, avaliação da pureza e determinação da identidade das proteínas produzidas foram executadas no Brasil e nos laboratórios apresentados em capítulo anteriores. Posteriormente, os demais experimentos que envolveram as culturas de células, os testes de exposição das células às substâncias testes, a obtenção do RNA total e a realização dos microarranjos de DNA foram completamente realizados no RIKILT – Institute of Food Safety, que faz parte da Universidade de Wageningen, na Holanda. Todos os laboratórios do RIKILT atendem as normas de biossegurança determinadas por órgãos fiscalizadores da União Europeia para trabalhos com produtos oriundos da tecnologia do DNA recombinante. Além disso, o RIKILT é certificado como um Laboratório Nacional de Referência e como Laboratório Europeu de Referência, possuindo, ainda, várias certificações do tipo ISO.

4 MÉTODOS

4.1 Produção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac em sistema heterólogo (*Escherichia coli*)

Todos os procedimentos pertinentes à obtenção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, que incluem: expressão e purificação das proteínas; quantificação de proteínas solúveis totais; análise da expressão das proteínas por SDS-PAGE; quantificação relativa da pureza das amostras; e, a determinação da sequência N-terminal das proteínas produzidas foram detalhadamente descritos na seção de Métodos do Capítulo II.

4.2 Produção das amostras de peptídeos de Cry8Ka5 e Cry1Ac

4.2.1 Digestão sequencial *in vitro* das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

O procedimento de digestão sequencial *in vitro* utilizando pepsina e tripsina foi realizado parcialmente de acordo com o protocolo da Farmacopeia Americana (USP 23, 1995) e também de acordo com o método descrito por Van de Wal *et al.* (1998), como descrito abaixo. A justificativa para essa fusão foi de ter uma boa representação do processo digestivo humano e, ao mesmo tempo, uma metodologia passível de se obter uma amostra de peptídeos de cada proteína ao final da digestão e em quantidades suficientes para a realização dos ensaios posteriores. Em primeiro lugar, 0,1 mg de pepsina foi solubilizada em 25 mL de fluido gástrico simulado - FGS (34 mM de NaCl, 0,7% de HCl, pH 1,2), parcialmente imerso em gelo. Em seguida, 10 mg da proteína Cry8Ka5 ou da Cry1Ac foram adicionados ao FGS e misturado. A mistura foi incubada num banho-maria a 37 ° C, sob agitação constante, durante 4 h. Em seguida, o pH da mistura foi ajustado para 7,8 com NaOH 1,0 M, e 0,1 mg de tripsina foi adicionado. A nova mistura foi incubada em banho-maria sob as mesmas condições. Após 4 h de incubação, 0,1 mg de SBTI foi adicionado à mistura para interromper a proteólise. O material digerido foi dialisado contra 1,0 L de água Milli-Q[®] em membrana de diálise com poro de 12 kDa, a 4 °C. O material dialisado foi liofilizado até volume aproximado de 5 mL e, imediatamente, submetido a uma nova diálise contra 2,0 L de água Milli-Q[®] em membrana de diálise de 100-500 Da, por 16 h, a 4 °C. A solução de peptídeos retida foi liofilizada e guardada à temperatura ambiente até a sua utilização. O procedimento foi repetido várias

vezes até o acúmulo de 10 mg da amostra de peptídeos de Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, e de Cry1Ac, denominada de Cry1Ac-pep. Foi obtida também uma amostra denominada “digestão controle”, obtida a partir do processo descrito acima, mas sem a presença de proteínas experimentais (teste ou controle).

4.2.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM)

Para verificar a eficiência do procedimento de digestão sequencial *in vitro* foram retiradas alíquotas em diferentes momentos do processo e, depois, realizadas CL-EM. Cinco amostras foram analisadas, sendo essas: 1. Cry8Ka5 digerida somente com pepsina; 2. Cry8Ka5 digerida com pepsina e tripsina (Cry8Ka5-pep); 3. Cry1Ac digerida somente com pepsina; 4. Cry1Ac digerida com pepsina e tripsina (Cry1Ac-pep); e, 5. Amostra da digestão contendo apenas pepsina, tripsina e inibidor de tripsina (digestão controle).

As análises em CL-EM foram realizadas utilizando o sistema de cromatografia UPLC[®] nanoAcquity com tecnologia 2-D acoplado ao espectrômetro de massas SYNAPT HDMS Q-TOF MS (Waters, Milford, MA, EUA). As pré-colunas para UPLC[®] de fase reversa utilizadas neste estudo foram obtidas da Waters (Milford, MA, EUA). Na primeira dimensão foi utilizada uma coluna XBridge[™], 300 mm x 50 mm, e os peptídeos foram eluídos em gradiente descontínuo com um fluxo de 2 µL/min, utilizando-se 13, 45 e 65% de acetonitrila em 20 mM de formiato de amônio, pH 10. Já na segunda dimensão foi utilizada uma coluna C18 Symmetry[®], 5 µm, 180 µm x 20 mm. Para maximizar a recuperação das amostras na coluna da 2^a dimensão, foi feita uma diluição em linha (10:1) dos peptídeos eluídos da 1^a dimensão com 0,1% de ácido fórmico em água a um fluxo de 20 µL/min. Os peptídeos foram separados com uma coluna analítica C18 BEH (130Å), 1,7 mm, 75 µm x 250 mm, a 0,2 µL/min, utilizando 0,1% de ácido fórmico em água como eluente A e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila como eluente B. A separação foi realizada utilizando-se 5% de B durante 1 min, 10% de B durante 2 min, 10-40% de B durante 62 min e 40-85% B ao longo de 9 min. Após 6 min de lavagem com 85% de B e um gradiente linear de volta para 5% de B, durante 2 min, a coluna foi reequilibrada às condições iniciais. A temperatura da coluna analítica foi mantida em 35 °C por um aquecedor de coluna embutido.

As análises de espectrometria de massas (MS) foram realizadas em modo de íon positivo ESI (+), utilizando ionização por “electrospray” (tensão capilar, 2,2 kV; temperatura da fonte, 80 °C; voltagem do cone, 24 V) com uma fonte NanoLockSpray. Como “lock mass”, [Glu1] fibrinopeptídeo B (1 pmol/µL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) foi entregue a

partir de uma bomba de seringa (Harvard Apparatus, EUA) ao “spray” de referência do NanoLockSpray a uma taxa de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. O canal lock mass foi carregado com a amostra a cada 10 s. Nano-CL-EM foi realizada com o SYNAPT HDMS (Waters) operando seja no modo MS^E ou no modo MS/MS de aquisição dependente de dados (DDA) de espectros de fragmentação de peptídeo MS/MS. Processamento e busca dos conjuntos de dados de MS/MS foram realizados utilizando o programa MASCOT 2012 (Matrix Science, Boston, EUA). Os parâmetros utilizados no modo Ion Search MS/MS incluíram pesquisa no banco de dados NCBIInr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), considerando os valores de carga com +1, +2 e +3, tolerância dos fragmentos de $\pm 0,5$ kDa e tendo apenas uma clivagem perdida. As modificações variáveis foram fixadas como carbamidometilação dos resíduos de cisteína e oxidação dos resíduos de metionina. A identificação foi considerada não ambígua quando o escore da proteína foi significativo ($p < 0,05$).

4.2.3 Digestão sequencial *in silico* das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

Para predição dos peptídeos resultantes da digestão sequencial *in vitro* da proteína Cry8Ka5 e da Cry1Ac e, dessa forma, comparar com os resultados da espectrometria de massas (peptídeos detectados) procedeu-se a digestão *in silico*, utilizando a sequência de aminoácidos primária das referidas proteínas através da ferramenta “on line” PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/). De acordo com as etapas da digestão *in vitro*, a sequência das proteínas foi hipoteticamente digerida com pepsina (pH 1,3, considerando apenas peptídeos com massa ≥ 500 Da). Os peptídeos obtidos foram, por sua vez, submetidos individualmente à digestão com tripsina (C terminal para K/R, mesmo antes de P, considerando apenas peptídeos com massa ≥ 500 Da). Todos os peptídeos foram anotados e utilizados para confirmação dos resultados do MS/MS.

4.2.4 Alinhamento múltiplo de sequências

A sequência primária completa das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac foram alinhadas com seus respectivos peptídeos, sejam aqueles obtidos na digestão com pepsina ou na digestão sequencial com pepsina e tripsina, utilizando a ferramenta “on line” Clustal Omega-Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). O formato escolhido para o alinhamento foi MSF, pois permite uma visualização clara da posição do peptídeo detectado na sequência completa da proteína digerida.

4.3 Ensaio de viabilidade celular: determinação de dose subcitotóxica das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac e dos peptídeos/proteínas controle

Células MCF-7 (número de passagem 12 a 18) e Caco-2 (número de passagem 36 a 44), ambas indiferenciadas, foram tratadas com tripsina, contadas e ressuspensas em seus respectivos meios de cultura (descritos no item 3.1.1.) para uma concentração final de 20.000 células/poço e 4.000 células/poço, respectivamente, para o ensaio de viabilidade celular, utilizando o kit ATP-Lite™. Placas de microtitulação de 96 poços foram semeadas com 100 µL de suspensão celular e, em seguida, incubadas durante 72 h para MCF-7 ou 48 h para as células Caco-2, numa atmosfera umidificada, a 37 °C, sob 5% de CO₂.

As soluções estoque da Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry1Ac e Cry1Ac-pep, e das proteínas controle Cry8Ka1, SBTX e PHA-E foram preparadas por suspensão de 2,44 mg de amostra em 0,2 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, (PBS) para obter soluções de 12.200 µg/mL. A solução estoque de microcistina-LR foi feita através da suspensão de 1,0 mg da proteína em 50 µL de DMSO puro, obtendo uma solução de 20,000 µg/mL. Por sua vez, a solução estoque de colistina foi preparada pela suspensão de 0,48 mg do peptídeo em 0,25 mL de PBS para obter uma solução de 1.920 µg/mL. Em seguida, as soluções estoque de Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry8Ka1, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, PHA-E e SBTX, a solução de microcistina e a de colistina foram diluídas 7,14; 28,56 e 3,57 vezes, respectivamente, em meio de cultura DMEM e, a partir dessas soluções diluídas, foram feitas diluições seriadas em DMEM (1:2, 1:4 e 1:8; v/v). Para a amostra de microcistina foi feita uma diluição extra da solução estoque de 38,08 vezes para encerrar uma concentração de 525 µg/mL. Todas as diluições foram adicionadas à suspensão de células formando um volume final de 117 µL em cada poço. A concentração final das amostras nos poços variou de 30,6 a 244,5 mg/mL, exceto para microcistina-LR que variou de 6,25 a 100 µg/mL e para colistina de 9,6 a 76,8 µg/mL. Foram realizados controles nas mesmas condições, contendo somente os veículos DMSO e PBS nas concentrações de 1,7 e 7%, respectivamente. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi renovado utilizando uma pipeta manual, seguido pela adição a cada poço de 50 µL de solução de lise de células de mamíferos (conteúdo do kit ATP-Lite™). A placa foi agitada durante 2 min usando um agitador de placas de microtitulação de 96 poços, seguido por adição de 50 µL de solução de substrato (conteúdo do kit ATP-Lite™). A placa foi novamente agitada durante 1 min usando um agitador de placas de microtitulação, coberto com um selo adesivo, adaptados ao escuro, durante 10 min e a luminescência é

medida utilizando um modo multi-leitor de microplacas (BIO-TEK Synergy HT, Winooski, VT, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra e concentração, bem como para cada linhagem celular.

4.4 Ensaio de exposição de células MCF-7 e Caco-2 às proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, às amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e aos peptídeos/proteínas controle para análise do perfil de expressão gênica

Células MCF-7 foram semeadas a uma densidade de 250.000 células/cm² em placas de 6 poços de poliéster, num volume de 4,0 ml de DMEM. Após 48 h, o meio de todos os poços foi renovado com apenas 2,4 mL de meio. Um dia depois, as células com 50 a 70% de confluência foram expostas durante 24 h a 100 µg/mL de Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry8Ka1, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, digestão controle, PHA-E ou SBTX. Da mesma forma, as células foram expostas aos demais controles colistina e microcistina-LR em concentrações de 1 e 25 µg/mL, respectivamente. Como mencionado no item 4.2, foram feitos controles com os veículos DMSO e PBS nas concentrações de 1,7 e 7%, respectivamente. A determinação das concentrações subcitotóxicas das amostras utilizadas neste ensaio basearam-se nos resultados do ensaio de viabilidade celular para ambas as linhagens de células. Essa decisão partiu do princípio de que as concentrações das proteínas utilizadas não podem causar danos severos às células, uma vez que, isso poderia dificultar uma análise adequada das respostas de expressão dos genes. Após a exposição, os meios foram removidos e as camadas de células foram lavadas uma vez com PBS gelado. Os lisados celulares foram obtidos por adição de 600 µL de tampão de lise de glóbulos vermelhos fornecido pelo kit RNeasy (Qiagen), suplementado com 10% de β-mercaptoetanol, em cada poço da placa e armazenado a -80 °C até a extração do RNA total. As exposições das células MCF-7 às amostras de proteínas foram realizadas triplicatas, com exceção das exposições somente aos veículos (tampão fosfato de sódio e DMSO) que foram feitas em sextuplicatas. Foram realizados três experimentos independentes nas condições referidas.

Para o ensaio de exposição que mimetiza características morfológicas e funcionais do epitélio intestinal humano foram utilizadas placas de 6 poços de poliéster Transwell[®]. Cada poço desse tipo de placa tem diâmetro interno de 24 mm e é composto por dois compartimentos, um superior e um inferior, que recebem meio de cultura e que se comunicam através de uma membrana semipermeável (0,4 µm de tamanho de poro), onde as células semeadas, no caso células Caco-2, se fixam e crescem para formar um epitélio com porção

apical e basal. Assim, as células Caco-2 foram semeadas a uma densidade de 40.000 células/cm² em 1,5 mL de DMEM nos compartimentos superiores dos poços. Apenas meio de cultura, 2,5 mL de DMEM, foi dispensado nos compartimentos inferiores. Dessa forma, as células Caco-2 foram cultivadas até permitir a sua diferenciação através de incubação durante 21 dias, a 37 °C, atmosfera com 5% de CO₂ e 100% de umidade. Os meios dos compartimentos superior e inferior das placas Transwell[®] foram renovados duas vezes por semana. Após as células terem atingido a diferenciação, o meio de cultura do compartimento superior foi substituído por 1,5 ml de DMEM contendo as amostras de proteínas descritas anteriormente, nas mesmas concentrações, durante 24 h, com exceção da amostra de colistina que não foi utilizada. O meio de cultura do compartimento inferior também foi renovado. Após o período de exposição, o meio do compartimento superior e inferior foi removido e a camada de células foi lavada uma vez com PBS gelado. Posteriormente, as células foram ressuspendidas em 600 µL de tampão de lise (RLT, fornecido no kit RNeasy), suplementado com 10% de β-mercaptoetanol, sendo os lisados armazenados a -80 °C até o momento do isolamento do RNA. As exposições das células Caco-2 às amostras de proteínas foram realizadas triplicatas, com exceção das exposições somente aos veículos (PBS e DMSO) que foram feitas em sextuplicatas. Foram realizados três experimentos independentes nas condições referidas.

4.5 Isolamento, purificação, quantificação e pureza das amostras de RNA total

O lisado das células de MCF-7 e Caco-2 tratadas com a proteína Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry8Ka1, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, PHA-E, SBTX, microcistina-LR e colistina, como descrito no item 4.3, foi utilizado para o isolamento do RNA total através dos kits RNase-Free DNase Set e RNeasy da Qiagen, seguindo as instruções contidas no manual do fabricante. Em linhas gerais, o procedimento de isolamento do RNA total foi feito da seguinte maneira: 1°. Lavagem com soluções-tampão específicas; 2°. Digestão do DNA; 3°. Novas lavagens; 4°. Centrifugações através de mini-colunas contendo resinas com afinidade a ácidos nucleicos; e, 5°. Centrifugações com soluções específicas para eluição de RNA. De cada lisado celular foi retirado 1,5 µL de cada suspensão e conduzido para leitura em um espectrofotômetro do tipo NanoDrop (Wilmington, NC, EUA) para dosar a concentração de RNA e também avaliar a pureza através da medição de absorção nas razões dos comprimentos de onda 260/280 e 230/280 nm. Um resultado da razão 260/280 próximo a 2,0 é aceito como RNA puro, enquanto para a razão 260/230 os valores devem variar de 2,0 a 2,2.

A integridade das amostras de RNA obtidas foi examinada utilizando o sistema de eletroforese automatizado Experion™ da Bio-Rad (Veenendaal, Holanda). Esse sistema emprega a tecnologia do chip microfluídico, onde ocorre a separação das amostras. Sucintamente, cada chip é formado por uma série de poços sobre uma placa de vidro pequena, gravada com uma rede de microcanais. Esses, por sua vez, são preenchidos com uma mistura de matriz de gel e corante fluorescente e, por último, são colocados 2 µL de amostra. Na estação de eletroforese, as amostras são conduzidas através dos microcanais, sendo as moléculas separadas de acordo seus tamanhos. Um laser excita o corante ligado aos fragmentos de RNA que emite fluorescência e o software do equipamento produz um electroferograma a partir da intensidade de fluorescência como uma função do tempo. A partir disso é gerada uma imagem de gel virtual. O sistema ainda gera automaticamente um indicador de qualidade do RNA (RQI), que é uma avaliação quantitativa da integridade do RNA (valores entre 9,5 e 10 são os ideais), além de razões entre os RNA's ribossomais e dados de concentração de RNA. Contudo, desses dados foram utilizados apenas o gel virtual e o RQI.

4.6 Hibridizações em microarranjos de DNA

Para realização das hibridizações de RNA em microarranjos de DNA, as amostras de RNA total, RQI > 9,5 e concentração de 100 ng/µL, foram enviadas congeladas e mantidas em gelo seco, num volume total de 15 µL, a companhia ServiceXS, sediada na cidade de Leiden, Holanda. A análise do perfil de expressão gênica (transcriptoma) foi realizada utilizando os chips do modelo Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChips (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA). Cada BeadChip contém 12 arranjos, cada arranjo encerra 48.000 sequências gênicas de genoma total dispostas em um “bead”. O kit de amplificação de RNA Ambion TotalPrep™ (Illumina) foi utilizado para transcrever 200 ng de RNA de acordo com as recomendações do fabricante. Um total de 750 ng de RNAc (RNA anti-senso) biotilado foi hibridado a 58 °C, durante 16 h, com as sequências de DNA do chip. A hibridização e a lavagem foram feitas de acordo com o manual da Illumina “Direct Hybridization Assay Guide”. Na hibridização, a ligação das sequências complementares excita os fluoróforos que emitem energia em um comprimento de onda específico, que, por sua vez, é uma medida indireta da quantidade de hibridizações que ocorreram. Posteriormente, os chips foram escaneados usando a leitora Illumina iScan (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA). A análise

das imagens e obtenção dos dados brutos de expressão foram realizados utilizando o “software” Illumina GenomeStudio v2011.1 Gene Expression, com configurações padrão (sem subtração de “background” e sem normalização).

4.6.1 Controle de qualidade e normalização dos dados dos microarranjos

Os dados dos microarranjos foram submetidos a controle de qualidade utilizando a ferramenta BioConductor (<http://www.bioconductor.org>) através da linguagem e ambiente estatístico R no MADMAX. Posteriormente, os arranjos foram normalizados por transformação estabilizadora da variância com MADMAX (LIN *et al.*, 2011). No programa Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA), a emissão de fundo (“background”) foi subtraída (valor de 100) e um nivelamento realizado (“flooring”) para o valor de 35. Em seguida, foi calculado o logaritmo na base 2 ($\log_2 x$) para cada arranjo zerado com a média da expressão do tratamento somente com os veículos (DMSO ou PBS). Para obter uma impressão do número de genes que tiveram sua expressão significativamente diferenciada, foram selecionados aqueles expressos (regulados) mais que 1,62 ($\log_2 1,62 = 0,7$) vezes para cima (superexpresso) ou para baixo (subexpresso) em, pelo menos, duas de três replicatas nos tratamentos experimentais (teste e controle) e que não tenham sido expressos mais que 1,41 ($\log_2 1,41 = 0,5$) vezes para cima ou para baixo em nenhuma das replicatas nos arranjos dos controles (DMSO ou PBS) em combinação com um $p < 0,01$ (*T*-test).

4.7 Interpretação biológica

4.7.1 Agrupamento hierárquico e análise de vias biológicas

Os dados dos microarranjos foram hierarquicamente agrupados usando os programas Cluster (correlação descentralizada; agrupamento por ligação de médias) e Treeview (EISEN *et al.*, 1998).

4.7.2 Análises funcionais dos genes com expressão diferenciada

O Metacore – programa disponível na Internet para interpretação funcional e biológica dos dados de expressão gênica – foi usado para análise das vias biológicas em cada sub-grupo do mapa de expressão (“heat map”) do agrupamento hierárquico. A super-representação de genes de vias de sinalização e vias metabólicas foi avaliada pela distribuição hipergeométrica (EKINS *et al.*, 2006). As vias biológicas com valor $p < 10^{-5}$ foram consideradas significantes.

4.7.3 Análise de enriquecimento de genes (GSEA)

Foi realizada a análise de enriquecimento de conjuntos de genes, utilizando o programa GSEA, uma ferramenta estatística para análise de dados de microarranjos, para descobrir a expressão diferencial de conjuntos de genes biologicamente relevantes e que compartilham aspectos funcionais e de regulação. Esses dados podem sugerir quais mecanismos moleculares foram afetados. O GSEA utiliza conjuntos de genes predefinidos, baseados em resultados de experimentos anteriores e dados disponíveis na literatura. Este programa tem vantagem sobre outras ferramentas estatísticas, visto que não é necessária a pré-seleção de genes expressos diferencialmente de forma significativa. Inicialmente, todos os genes são classificados com base no seu nível de expressão, comparando os tratamentos teste com os controles. Em seguida, é calculado se um determinado conjunto de genes é significativamente enriquecido no topo ou na base de uma lista de classificação baseada no sinal de ruído (“signal to noise-based”) ou se está distribuído randomicamente (SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). Isto permite que conjuntos de genes significativamente afetados sejam detectados, mesmo quando a expressão dos genes individuais foi alterada em níveis relativamente modestos. A análise de enriquecimento foi realizada para todos os tratamentos vs. controles. Conjuntos de genes com valor $p < 0,05$ e FDR $< 0,25$ foram considerados significativamente afetados. Para as análises de enriquecimento foram utilizados conjuntos de genes da base de dados BioCarta-2 (<http://www.biocarta.com/>).

4.7.4 Análises de Mapa Conectivo (“Connectivity Map analysis”) dos dados dos microarranjos

A natureza dos processos e das vias afetadas pelas proteínas foi avaliada por meio do banco de dados e algoritmo de busca Mapa Conectivo (“Connectivity Map database”) (LAMB *et al.*, 2006; LAMB *et al.*, 2007). Usando o Mapa Conectivo, foi feita uma pesquisa

de similaridade com assinaturas (dados de expressão) conhecidas de compostos terapêuticos, obtidos principalmente com a linhagem celular MCF-7, sendo a similaridade classificada de acordo com uma pontuação de conectividade, representando semelhança relativa à lista do gene importado. Para tal fim, os Illumina IDs dos genes significativamente regulados para cima ou para baixo em cada grupo foram primeiramente convertidos em Affymetrix U133A Ids, utilizando o programa Martview (<http://www.biomart.org/biomart/martview/>) e, posteriormente, foram baixados para o Mapa Conectivo (<http://www.broad.mit.edu/cmap/>).

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

Foi obtida a quantidade necessária da proteína Cry8Ka5 e da Cry1Ac (20 mg de cada entomotoxina) para os testes de viabilidade celular e para os ensaios de exposição das células e análise do perfil de expressão gênica descritos anteriormente. Detalhes pertinentes ao rendimento da expressão heteróloga e purificação, perfil eletroforético, pureza e confirmação da identidade das proteínas Cry produzidas estão descritos com detalhes no item 5.4 do Capítulo II.

5.2 Obtenção das amostras de peptídeos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac

Foram obtidos 20 mg da amostra de peptídeos da proteína Cry8Ka5 e da Cry1Ac, bem como 20 mg da amostra de peptídeos oriundos da digestão controle contendo apenas material residual de pepsina e tripsina. A identificação dos peptídeos obtidos e, conseqüente, validação do procedimento de digestão sequencial *in vitro* das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac será mostrada a seguir.

5.2.1 Identificação dos peptídeos nas amostras digeridas de Cry8Ka5 e Cry1Ac

Na Tabela 4.1, é possível visualizar os peptídeos identificados através do MASCOT numa pesquisa contra o banco de dados NCBIInr nas amostras de Cry8Ka5 e Cry1Ac digeridas somente com pepsina ou digeridas sequencialmente com pepsina e tripsina (digestão sequencial *in vitro*). Assim, na amostra de Cry8Ka5 tratada somente com pepsina foram identificados 5 peptídeos presentes também na toxina Bt Cry8Ka2, bem como na

amostra tratada sequencialmente com pepsina e tripsina, que foi identificado 1 peptídeo presente na Cry8Ka2. Outros 2 peptídeos identificados na amostra proveniente da digestão sequencial da Cry8Ka5 foram similares àqueles presentes na sequência da tripsina. Já para as amostras oriundas da digestão da Cry1Ac com pepsina e pepsina seguida de tripsina foram identificados 13 peptídeos no total. Na amostra tratada com pepsina foram identificados 10 peptídeos da própria Cry1Ac em sequências anotadas no banco de dados. Da amostra digerida sequencialmente foram identificados 3 peptídeos, sendo 1 de Cry1Ac, 1 de Cry1Ab e 1 de tripsina. Por sua vez, na amostra controle foram identificados 3 peptídeos de tripsina.

Para confirmar os resultados do MASCOT, os peptídeos identificados foram comparados àqueles da digestão *in silico*, seja somente com pepsina ou sequencial, pepsina seguida de tripsina (dados não-mostrados). Todos os peptídeos identificados como da toxina Cry8Ka2 também estão presentes na Cry8Ka5. Da mesma forma, todos os peptídeos identificados como da proteína Cry1Ac estão realmente presentes na sequência da amostra estudada, bem como o peptídeo identificado com aquele da proteína Cry1Ab. Além disso, os peptídeos identificados como da tripsina fazem parte da sequência de aminoácidos primária da tripsina de pâncreas bovino utilizada.

Na Figura 4.2, está mostrado o alinhamento da sequência das duas proteínas, Cry8Ka5 e Cry1Ac, com os respectivos peptídeos identificados nas duas diferentes situações de digestão, somente pepsina e pepsina seguida de tripsina. É possível visualizar a posição de cada peptídeo na sequência de ambas as proteínas, bem como confirmar a identidade dos mesmos.

5.3 Viabilidade celular

Para definir doses subcitotóxicas das proteínas Cry8Ka5, Cry1Ac e das demais utilizadas, foi realizado o teste de viabilidade celular com a linhagem humana de carcinoma de mama MCF-7 e de carcinoma de cólon Caco-2, ambas indiferenciadas, após 24 h de exposição, medida através do kit ATPlite™. No Gráfico 4.1, é possível visualizar o resultado do teste de viabilidade celular com ambas as linhagens celulares indiferenciadas na presença da Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry1Ac, Cry1Ac-pep e de várias outras amostras de proteínas e peptídeos, em diferentes concentrações. Em (A), as amostras Cry8Ka5 e Cry1Ac e as suas amostras de peptídeos Cr8Ka5-pep e Cry1Ac-pep, bem como da digestão controle, em concentrações variando de 30,6 a 244,5 µg/mL, não reduziram a viabilidade celular de forma acentuada a < 80% de qualquer uma das linhagens, mesmo na maior concentração. Da mesma

forma, em (B), PHA-E e SBTX não reduziram a < 80% a viabilidade celular de MCF-7 e Caco-2, nas mesmas concentrações. Em (C), o peptídeo cíclico colistina também não reduziu a viabilidade das mesmas linhagens a < 80% em concentrações variando de 9,6 a 76,8 µg/mL, mesmo na dose mais elevada. Por fim, em (D), a toxina de cianobactérias, microcistina-LR, não diminuiu a viabilidade celular de Caco-2 em concentração de até 100 µg/mL, mas para MCF-7 apenas 50 µg/mL foram suficientes para reduzir a viabilidade celular a quase 60%.

A fim de confirmar os resultados obtidos pelo ATPlite™, as culturas de células MCF-7, uma vez que foram as mais sensíveis às proteínas, foram visualizadas em microscópio acoplado a uma câmera digital para verificação da integridade e do nível de confluência das células. Na Figura 4.3, é possível visualizar imagens das culturas de células MCF-7 expostas às concentrações próximas daquelas previamente pensadas para serem utilizadas no ensaio de exposição das mesmas para análise do perfil de expressão gênica, ou seja, em concentrações que não devem reduzir a viabilidade celular a < 80%. Com exceção das células expostas a PHA-E na concentração de 122,5 µg/mL, as demais culturas tratadas com as amostras Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry8Ka1, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, digestão controle, SBTX, colistina (somente em MCF-7), microcistina e, ainda, as células expostas somente ao PBS ou ao DMSO apresentaram integridade de suas membranas celulares e percentual de confluência (> 80%) condizente com os resultados do ATPlite™. Por outro lado, as células tratadas com PHA-E apresentaram diminuição acentuada de citoplasma e também redução da confluência a ca. 30-40%. Dessa forma, apenas para as células MCF-7 tratadas com PHA-E, o resultado do ATPlite™ não representou bem o status real da viabilidade celular. Assim, essa amostra deveria ser utilizada nos ensaios de exposição numa concentração mais baixa (< 122,5 µg/mL).

Dado os resultados do ensaio de viabilidade celular, foi definida uma concentração de cada amostra proteica para ser utilizada nos testes de exposição das células MCF-7 indiferenciadas e Caco-2 diferenciadas, como se segue: 1) 100 µg/mL para Cry8Ka1, Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry8Ka1, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, digestão controle, SBTX e PHA-E; 2) 1 µg/mL para colistina; e, 3) 25 µg/mL para microcistina.

Tabela 4.1 - Peptídeos identificados através do MASCOT numa pesquisa contra o banco de dados NCBIInr das amostras de Cry8Ka5 e Cry1Ac digeridas somente com pepsina e digeridas sequencialmente com pepsina e tripsina (digestão sequencial *in vitro*)

Amostra	Genbank gi (UniProtKB N°./nome da proteína*)	Escore total/peptídeos encontrados/ M.M. (Da) [†] /pI/cobertura %	Mr (observada)	Mr (esperada)	Mr (calculada)	Peptídeos (escore/erro de massa (Da)/enzima)
Cry8Ka5 digerida com pepsina	gi 225348557 (COLUW1/ Cry8Ka2 delta-endotoxin)	59/6(1)/133222/4.91/3	922.4517	921.4444	921.4556	¹⁹⁶ L.ATYAQAANL.H ²⁰⁴ (38/-0.0111/Pepsin)
			485.7336	969.4526	969.4556	²³⁰ F.YREQVEF.T ²³⁶ (17/-0.0029/Pepsin)
			516.2979	515.2906	515.2955	²⁷⁹ L.DVVAL.F ²⁸³ (5/-0.0049/Pepsin)
			890.4080	889.4007	889.4141	⁴³⁰ F.DGISTNNGL.V ⁴³⁸ (28/-0.0134/Pepsin)
			819.4324	818.4251	818.4385	⁴⁵⁴ L.KDTITEL.P ⁴⁶⁰ (59/-0.0134/Pepsin)
Cry8Ka5 digerida com pepsina e tripsina [#]	gi 6755893 (Q9ROT7/ Pancreatic trypsin) gi 22534855 (COLUW1/ Cry8Ka2 delta-endotoxin) gi 2392548 (P00760/Cationic trypsin)	99/2(2)/26257/5.48/4 85/3(2)/133222/4.91/1 81/2(2)/23276/8.80/13	587.8232	1173.6318	1173.6427	⁸⁰ K.TLNNDIMLIK.L ⁸⁹ (78/-0.0109/Trypsin)
			456.7663	911.5180	911.5189	³⁹⁰ R.TNPVIVNR.Y ³⁹⁷ (44/-0.0008/Trypsin)
			554.2632	1106.5118	1106.5278	⁶⁰² K.STMSQDTPLK.Y ⁶¹¹ (62/-0.0159/Trypsin)
			1082.0282	2162.0418	2162.0491	⁵⁰ R.LGEDNINVEGNEQFISASK.S ⁶⁹ (66/-0.0073/Trypsin)
			577.2846	1152.5546	1152.5663	¹²⁶ K.SSGTSYPDVLK.C ¹³⁶ (56/-0.0116/Trypsin)

Tabela 4.1 (CONTINUAÇÃO) - Peptídeos identificados através do MASCOT numa pesquisa contra o banco de dados NCBIInr das amostras de Cry8Ka5 e Cry1Ac digeridas somente com pepsina e digeridas sequencialmente com pepsina e tripsina (digestão sequencial *in vitro*)

Amostra	Genbank gi (UniProtKB N°./Nome da proteína*)	Escore total/ Peptídeos encontrados/M.M (Da) [†] /pI/cobertura %	Mr (observada)	Mr (esperada)	Mr (calculada)	Peptídeos (escore/erro de massa (Da)/enzima)
Cry1Ac digerida com pepsina	gi 1171235 (Q45721/ CryIA(c))	49/6(2)/67982/5.80/8	729.3669	728.3596	728.4068	⁷⁸ L.VQIEQL.I ⁸³ (32/-0.0472/Pepsin)
			699.8232	1397.6318	1397.6575	¹¹⁵ F.REWEADPTNPAL.R ¹²⁶ (50/-0.0257/Pepsin)
			764.3109	763.3036	763.3170	¹³⁵ F.NDMNSAL.T ¹⁴¹ (33/-0.0134/Pepsin)
			615.3503	614.3430	614.3639	¹⁴² L.TTAIPL.L ¹⁴⁷ (15/-0.0209/Pepsin)
			676.8121	1351.6096	1351.6368	¹⁸⁵ F.DAATINSRYNDL.T ¹⁹⁶ (37/-0.0271/Pepsin)
	gi 169930482 (D2CN95/ truncated Cry1Ac)	58/8(2)/69457/5.60/7	1061.5254	1060.5181	1060.5401	⁵⁵¹ F.SNTVPATATSL.D ⁵⁶¹ (10/-0.219/Pepsin)
			603.2902	1204.5658	1204.6452	²⁶⁴ L.TREIYTNPVL.E ²⁷³ (48/-0.0793/Pepsin)
			1001.5348	2001.0550	2001.0531	⁴⁶³ F.NNIASDSITQIPAVKGNF.L ⁴⁸¹ (27/0.0020/Pepsin)
			1137.5144	1136.5071	1136.5251	⁵⁴² L.NVNWGNSSIF.S ⁵⁵¹ (19/-0.0179/Pepsin)
			714.4280	713.4207	713.4323	⁶⁰⁶ F.IPVSTATL.E ⁶¹² (31/-0.0116/Pepsin)

Tabela 4.1 (CONCLUSÃO) - Peptídeos identificados através do MASCOT numa pesquisa contra o banco de dados NCBIInr das amostras de Cry8Ka5 e Cry1Ac digeridas somente com pepsina e digeridas sequencialmente com pepsina e tripsina (digestão sequencial *in vitro*)

Amostra	Genbank gi (UniProtKB N°./Nome da proteína*)	Escore total/ peptídeos encontrados/ M.M. (Da) [†] /pI/ cobertura %	Mr (observada)	Mr (esperada)	Mr (calculada)	Peptídeos (escore/erro de massa (Da)/enzima)
Cry1Ac digerida com pepsina e tripsina	gi 338225380 [F8U024/ Cry1Ab)	53/1(1)/30885/5.36/4	605.8055	1209.5964	1209.5990	²⁶¹ K.HETVNVPGTGSL.- ²⁷² (53/-0.0025/Trypsin)
	gi 2392548 (P00760/ cationic trypsin)	40/2(1)/23276/8.80/4	577.2786	1152.5426	1152.5663	¹²⁶ K.SSGTSYPDVLK.C ¹³⁶ (40/-0.0236/Trypsin)
	gi 196051459 (B5B381/ Insecticidal crystal protein Cry1Ac)	64/1(1)/59279/7.94/2	627.3244	1252.6342	1252.6412	²⁴⁴ R.SGFSNSSVSIIR.A ²⁵⁵ (64/-0.0069/Trypsin)
Digestão controle [‡]	gi 5542503 (P00760/ /cationic trypsin)	123/4(2)/24704/8.23/8	577.2907	1152.5668	1152.5663	¹⁴⁰ K.SSGTSYPDVLK.C ¹⁵⁰ (63/0.0006/Trypsin)
	gi 576017 (P00763/ anionic trypsin-2)	78/1(1)/23783/4	510.7581	1019.5016	1019.4957	¹⁵⁴ K.APILSDSSCK.S ¹⁶³ (60/0.0059/Trypsin)
			587.8303	1173.6460	1173.6427	⁸⁰ K.TLNNDIMLIK.L ⁸⁹ (78/0.0033/Trypsin)

*<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>;

[†]Massa molecular (Da);

[#]Digerida inicialmente com pepsina e depois com tripsina;

[‡]Presença apenas das enzimas pepsina e tripsina e do inibidor de tripsina.

Figura 4.2 - Alinhamento múltiplo de seqüências entre as proteínas Cry8Ka5 (A) e Cry1Ac (B) e suas respectivas amostras de peptídeos obtidos por digestão com pepsina e digestão sequencial com pepsina e tripsina, ambas *in vitro*. O alinhamento foi feito utilizando a ferramenta gratuita na Internet, Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)



Gráfico 4.1 - Viabilidade celular da linhagem humana de carcinoma de mama MCF-7 e de carcinoma de cólon Caco-2, ambas indiferenciadas, após 24 h de exposição às proteínas teste Cry8Ka5 e Cry1Ac, as amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e a várias proteínas controle, medida através do teste ATPlite™. A viabilidade relativa foi obtida com base no percentual de viabilidade das células tratadas apenas com os veículos, DMSO ou PBS. Resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão de uma triplicata. A) Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry8Ka1, Cry1Ac, Cry1Ac-pep e a digestão controle, em concentrações variando de 30,6 a 244,5 $\mu\text{g/mL}$; B) PHA-E (eritrohemaglutinina de *P. vulgaris*) e SBTX (toxina da soja) em concentrações variando de 30,6 a 244,5 $\mu\text{g/mL}$; C) Microcistina-LR em concentrações variando de 50 a 100 $\mu\text{g/mL}$; D) Colistina em concentrações variando de 9,6 a 76,8 $\mu\text{g/mL}$

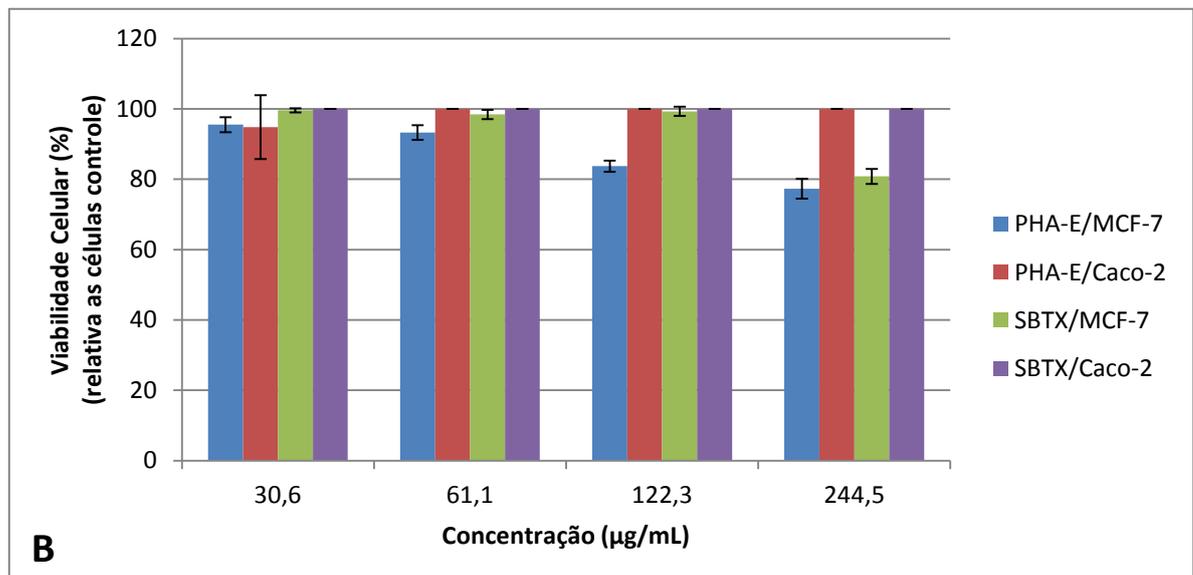
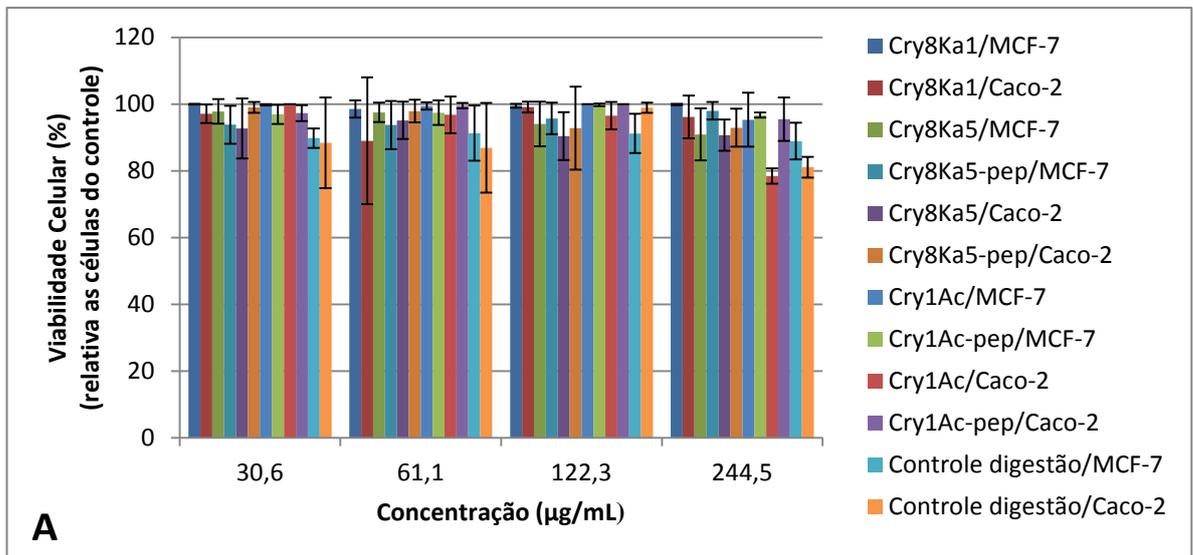


Gráfico 4.1 (CONCLUSÃO) - Viabilidade celular da linhagem humana de carcinoma de mama MCF-7 e de carcinoma de cólon Caco-2, ambas indiferenciadas, após 24 h de exposição às proteínas teste Cry8Ka5 e Cry1Ac, as amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e a várias proteínas controle, medida através do teste ATPlite™. A viabilidade relativa foi obtida com base no percentual de viabilidade das células tratadas apenas com os veículos, DMSO ou PBS. Resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão de uma triplicata. A) Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry8Ka1, Cry1Ac, Cry1Ac-pep e a digestão controle, em concentrações variando de 30,6 a 244,5 $\mu\text{g/mL}$; B) PHA-E (eritrohemaglutinina de *P. vulgaris*) e SBTX (toxina da soja) em concentrações variando de 30,6 a 244,5 $\mu\text{g/mL}$; C) Colistina em concentrações variando de 9,6 a 76,8 $\mu\text{g/mL}$; D) Microcistina-LR em concentrações variando de 50 a 100 $\mu\text{g/mL}$

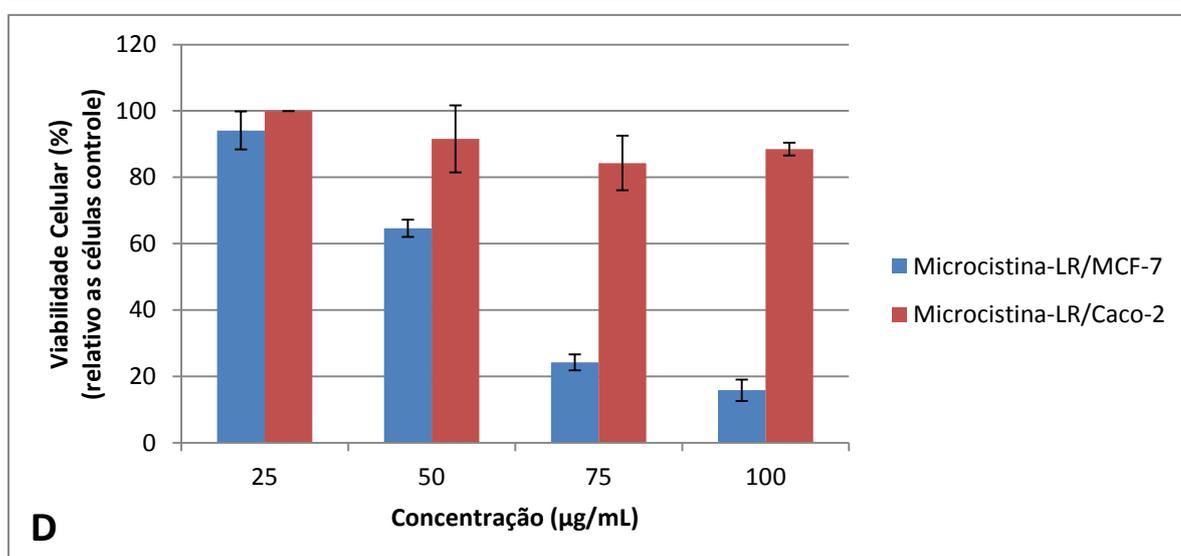
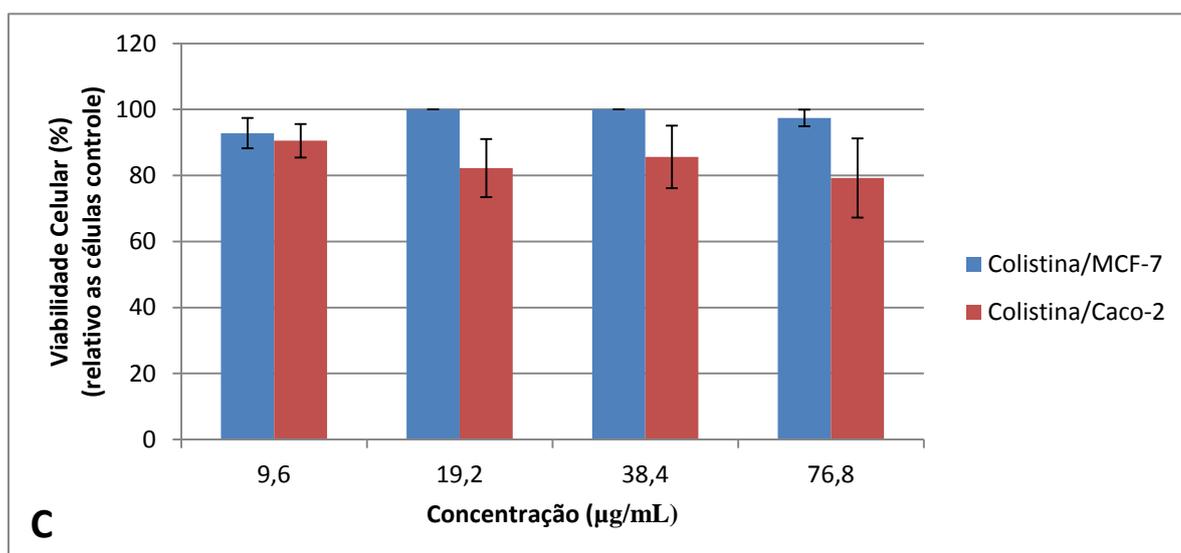


Figura 4.3 - Células de carcinoma de mama MCF-7 expostas às proteínas teste Cry8Ka5 e Cry1Ac, as amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e a várias proteínas controle, por 24 h. (A) Cry8Ka1; (B) Cry8Ka5; (C) Cry8Ka5-pep; (D) Cry1Ac; (E) Cry1Ac-pep; (F) Digestão controle; (G) PHA-E; (H) SBTX, todas na concentração de 122,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (I) Colistina 76,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (J) PBS 7%; (K) Microcistina-LR 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e, (L) DMSO 0,25 %. A barra de escala de todas as imagens é 200 μm

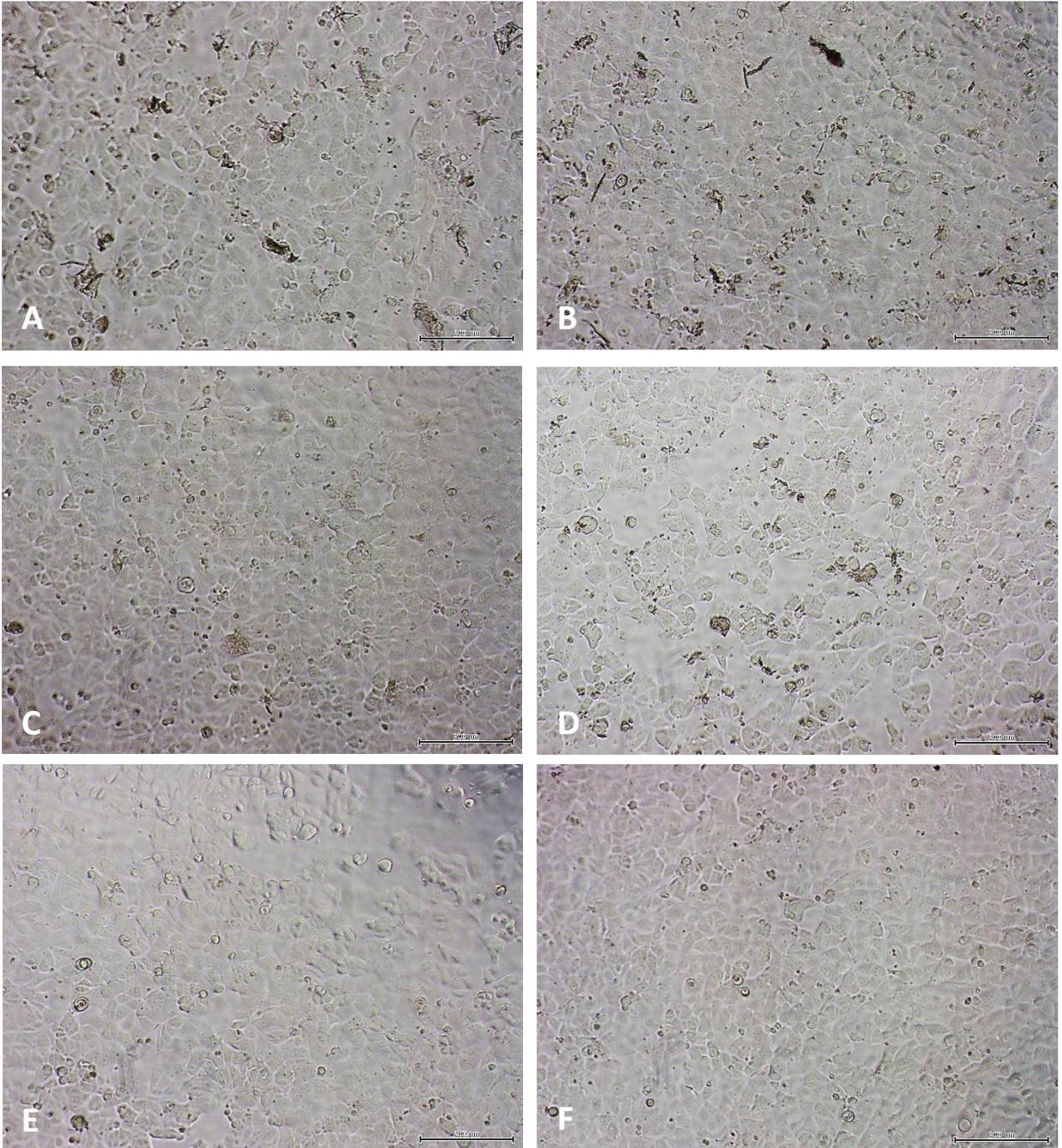
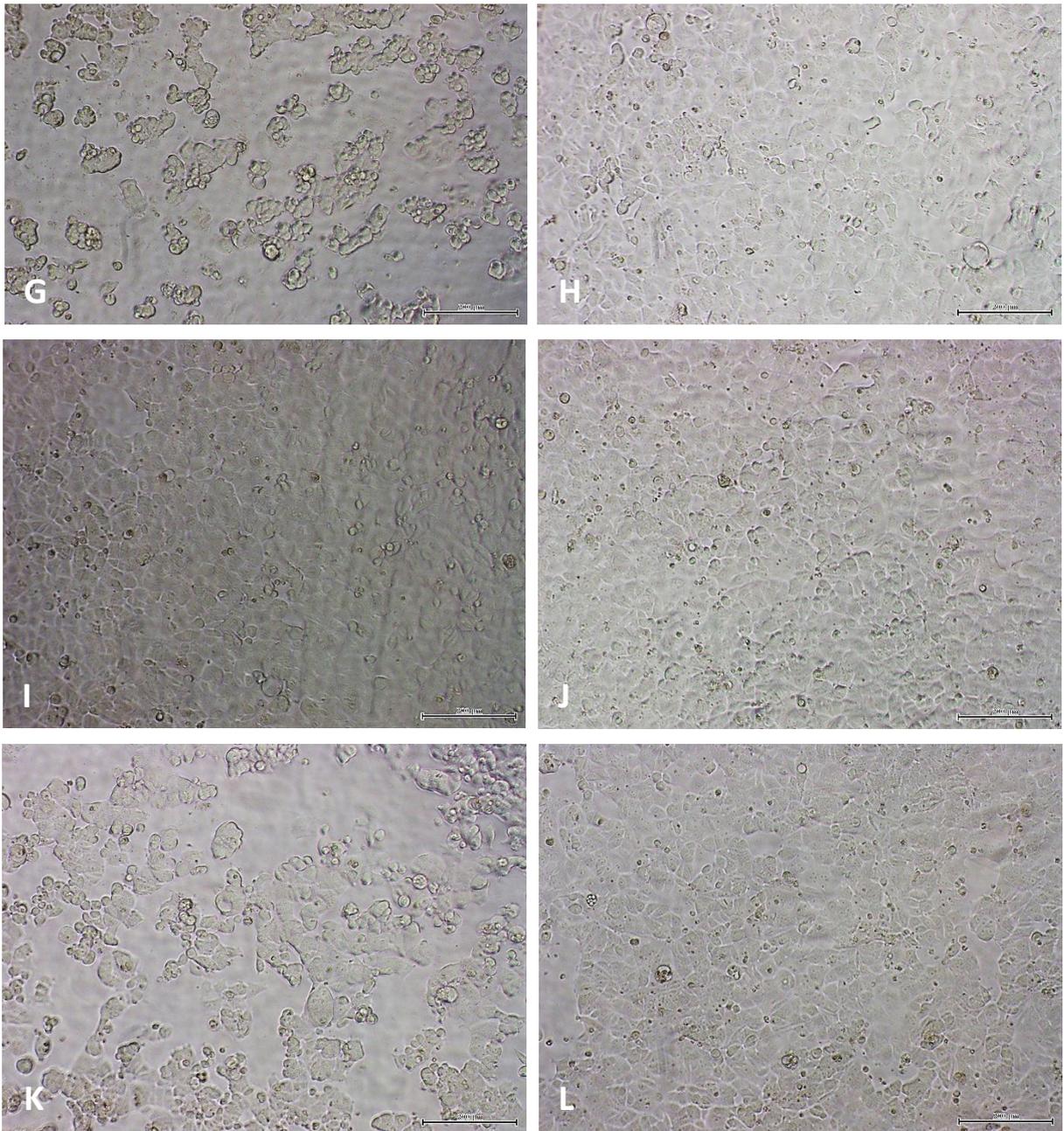


Figura 4.3 (CONCLUSÃO) - Células de carcinoma de mama MCF-7 expostas às proteínas teste Cry8Ka5 e Cry1Ac, as amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e a várias proteínas controle, por 24 h. (A) Cry8Ka1; (B) Cry8Ka5; (C) Cry8Ka5-pep; (D) Cry1Ac; (E) Cry1Ac-pep; (F) Digestão controle; (G) PHA-E; (H) SBTX, todas na concentração de 122,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (I) Colistina 76,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (J) PBS 7%; (K) Microcistina-LR 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e, (L) DMSO 0,25 %. A barra de escala de todas as imagens é 200 μm



5.4 Análises de expressão gênica

5.4.1 Células MCF-7 indiferenciadas

Após a exposição das células MCF-7 indiferenciadas às amostras proteicas Cry8Ka1, Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, digestão controle, SBTX, PHA-E, colistina e microcistina-LR, durante 24 h, o RNA dessas células foi isolado e submetido à análise da expressão de genes utilizando Beadchips Illumina. Um arranjo, o que corresponde a uma das três exposições (triplicata) de MCF-7 a Cry8Ka5, não passou no controle de qualidade e foi excluído da análise. Para se obter uma impressão do número de genes que tiveram sua expressão significativamente diferenciada, foram selecionados aqueles expressos mais que 1,62 ($2\log 0,7$) vezes para cima (superexpresso) ou para baixo (subexpresso) em, pelo menos, duas de três replicatas nos tratamentos experimentais (teste e controle) em combinação com um $p < 0,01$ (*T*-test). Com respeito à Cry8Ka5, a seleção baseou-se no critério $> 1,62$ vezes de regulação para cima ou para baixo em cada uma das duas repetições em combinação com um $p < 0,01$ (*T*-test). O número de genes expressos diferencialmente está indicado na Tabela 4.2. Um total de 449 “spots”, o que representa 414 genes originais, foi encontrado como sendo afetado por, pelo menos, um tipo de tratamento. A exposição de células MCF-7 à microcistina-LR (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resultou em um maior número de genes afetados, seguido de Cry1Ac e SBTX. É interessante notar que, em contraste com a proteína Cry1Ac íntegra, a amostra peptídeos de Cry1Ac não teve qualquer efeito significativo sobre a expressão gênica de MCF-7.

5.4.2 Células Caco-2 diferenciadas

Da mesma forma, as amostras de RNA total isolados das células Caco-2 diferenciadas tratadas com Cry8Ka1, Cry8Ka5, Cry8Ka5-pep, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, SBTX, PHA-E e microcistina, por 24 h, foram hibridizadas com sequências de genoma integral dispostas em arranjos em BeadChips Illumina. “Spots”/genes que mostraram expressão significativamente alterada foram contadas utilizando os mesmos critérios de seleção descritos no item anterior (5.4.1). Um total de 80 “spots”, correspondente a 80 genes, foram considerados diferencialmente afetados por, pelo menos, um tipo de tratamento (TABELA

4.2). Como também foi o caso para MCF-7, os efeitos mais pronunciados sobre a expressão do gene foi encontrado com células Caco-2 expostas a microcistina-LR.

Tabela 4.2 – Número de genes/”spots” diferencialmente afetados em células MCF-7 indiferenciadas e Caco-2 diferenciadas após tratamento com as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, com as amostras de peptídeos Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep e demais amostras controle proteicas, por 24 h*

Linhagem celular	Amostra	Nº genes (“spots”) afetados	Nº genes (“spots”) superexpressos	Nº genes (“spots”) subexpressos
MCF-7	Cry8Ka1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Cry8Ka5	9 (9)	4(4)	5(5)
	Cry8Ka5-pep	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Cry1Ac	97 (102)	44 (46)	53 (56)
	Cry1Ac-pep	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Digestão controle	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	SBTX	76 (85)	75 (84)	1 (1)
	PHA-E	3 (1)	2 (2)	1 (1)
	Colistina	1 (1)	1 (1)	0 (0)
	Microcistina-LR	268 (290)	155 (172)	113 (118)
Caco-2 [#]	Cry8Ka1	7 (7)	0 (0)	7 (7)
	Cry8Ka5	3 (3)	0 (0)	3 (3)
	Cry8Ka5-pep	2 (2)	0 (0)	2 (2)
	Cry1Ac	1 (1)	1 (1)	0 (0)
	Cry1Ac-pep	1 (1)	0 (0)	1 (1)
	Digestão controle	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	SBTX	4 (1)	1 (1)	3 (3)
	PHA-E	4 (1)	1 (1)	3 (3)
	Microcistina-LR	61 (67)	60 (66)	1 (1)

*Genes/“spots” diferencialmente expressos foram selecionados com base no critério $> 1,62$ vezes regulado para cima (superexpresso) ou para baixo (subexpresso) em, pelo menos, duas de três replicatas de todos os tratamentos experimentais em combinação com um $p < 0,01$ (*T*-test);

[#]As células Caco-2 não foram expostas ao tratamento com colistina.

5.5 Agrupamento hierárquico e análise de vias biológicas

5.5.1 MCF-7

Agrupamento hierárquico supervisionado foi realizado para os 449 “spots” expressos diferencialmente. Como mostrado na Figura 4.4 A, 5 agrupamentos (“clusters”) de genes principais, A - E, puderam ser distinguidos e foram examinados quanto à super-representação de genes envolvidos em vias ou processos biológicos, utilizando a ferramenta para análise de processos MetaCore. Esses agrupamentos gênicos e alguns genes representativos afetados serão descritos a seguir. Os genes no agrupamento A foram regulados para baixo principalmente pela microcistina e, até certo ponto, também por Cry1Ac (proteína íntegra). Genes nesse agrupamento estão envolvidos na via do complemento (componentes do complemento C5a e C5b), sinalização da proteína G (GPR30, caveolina-1 e adenilato ciclase) e organização da cromatina/nucleossoma (histona HIST1H2AE). O agrupamento de genes B foi regulado para baixo particularmente em células expostas a Cry1Ac e de uma forma menos pronunciada também em células tratadas com microcistina. Esses genes codificam proteínas envolvidas na glucoronidação (UGT2B15, UGT2B17, UGT2B28) e também na biossíntese e metabolismo de hormônios esteróides (testosterona e estradiol). Genes no agrupamento C foram regulados para cima principalmente por Cry1Ac e estão envolvidos em processos relacionados com a via do complemento (C5 convertase, Fator Ba, Fator Bb), glicólise (enolase 2), remodelação do citoesqueleto (queratina 1, queratina 81, queratina HB6, β -tubulina) e metabolismo de dNTP's (nucleosídeo-difosfato quinase, adenilato cinase 3). O agrupamento D representa genes que foram regulados para cima pela microcistina e estão envolvidas em muitos processos, incluindo regulação do metabolismo celular mediado por AP-1 (c-Fos, JunB, GCL reg, PLAUR, IFN- β), sinalização do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (c-Fos, JunB, EGR1, ATF-3, GCL reg, PLAUR, IFN- β), sinalização do hormônio do crescimento (c-Fos, JunB, C/EBPbeta, C/EBPzeta, EGR1), sinalização da IL-3 (sinalização c-Fos, EGR1, ID1), resposta ao estresse (MDA-5, IRF9, ISG15, RIG-G, DNAJC3) e atividade monoxigenase cetosteróide (aldo-ceto reductases AKR1C1 e AKR1C4). A maioria dos genes no agrupamento E foram altamente regulados pra cima pela SBTX e, em certa medida, também por microcistina. Genes desse agrupamento estão envolvidos na sinalização de IL-1 (c-Jun, endotelina-1, IRF1, I-kB), resposta ao estresse, indução da transição epitelial-mesenquimal (c-Jun, endotelina-1, claudina), resposta ao

estresse e apoptose mediada por PKR (IRF-1, ATF-4, I-kB, NFkB1A) e resposta ao estresse via retículo endoplasmático (ER) (c-Jun, ATF-4, I-kB).

5.5.2 *Caco-2*

Um total de 80 “spots”, selecionadas como descrito acima, foi submetido à análise de agrupamento hierárquico. Como indicado na Figura 4.4 B, 4 agrupamentos de genes, A - D, puderam ser identificados e foram analisados utilizando o MetaCore. Três dos quatro genes no conjunto A, codificam isoformas de metalotioneínas (MT1G, MT1X, MT2A), foram regulados para baixo pela PHA-E. Essas proteínas estão envolvidos na resposta celular aos metais. O agrupamento B inclui genes que foram regulados para cima pela microcistina, mas regulados para baixo por todas as outras amostras de proteínas, incluindo as amostras de peptídeos. As análises no MetaCore evidenciaram dois processos sendo afetados: formação da matriz extracelular (ECM) (mucina 17) e ligação à RNA (TNR6B). Genes pertencentes ao grupo C foram regulados para cima pela microcistina e estão envolvidos na sinalização de GnRH (FosB, ATF-3, MKP-1 ou DUSP1) e remodelação de ECM (laminina 5 ou LAMC2, SERPINE2, PLAUR, IL-8, HB-EGF). O agrupamento D contém dois genes, Ccl20 e Ubd. Ccl20 foi regulado para cima pela Cry1Ac e SBTX e codifica uma citocina que atrai os linfócitos e células dendríticas para as células epiteliais. Regulação da expressão de Ccl20 pode ocorrer através de receptores “Toll-like” (TLR) e sinalização de IL-17. Ubd foi regulada para baixo pela PHA-E e codifica a ubiquitina D que é degradada pelo proteassoma e também tem como alvo proteínas do proteassoma para degradação.

Figura 4.4 – Mapas de expressão (“heat-maps”) mostrando os genes expressos diferencialmente em células MCF-7 (A) e células diferenciadas Caco-2 (B) após tratamento por 24 h com Cry8Ka5, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, Cry8Ka5-pep e demais proteínas/peptídeos controle. Genes regulados > 1,62 vezes para cima ou para baixo regulados em, pelos menos, duas das três repetições foram selecionados e não afetados > 1,41 nos arranjos dos veículos (DMSO e PBS). Verde - representa regulação para baixo; preto - nenhuma mudança; e, vermelho - regulação para cima. A intensidade da cor relacionada com a proporção de 2log de regulação para cima ou para baixo é indicada pela barra. No mapa de MCF-7, 5 grupos de padrões de expressão de gene (A - E) podem ser distinguidos, enquanto para Caco-2, são 4 agrupamentos de genes (A - D). Caminhos ou processos biológicos para os quais genes estão super-representados em agrupamentos foram definidos de acordo com análise no MetaCore

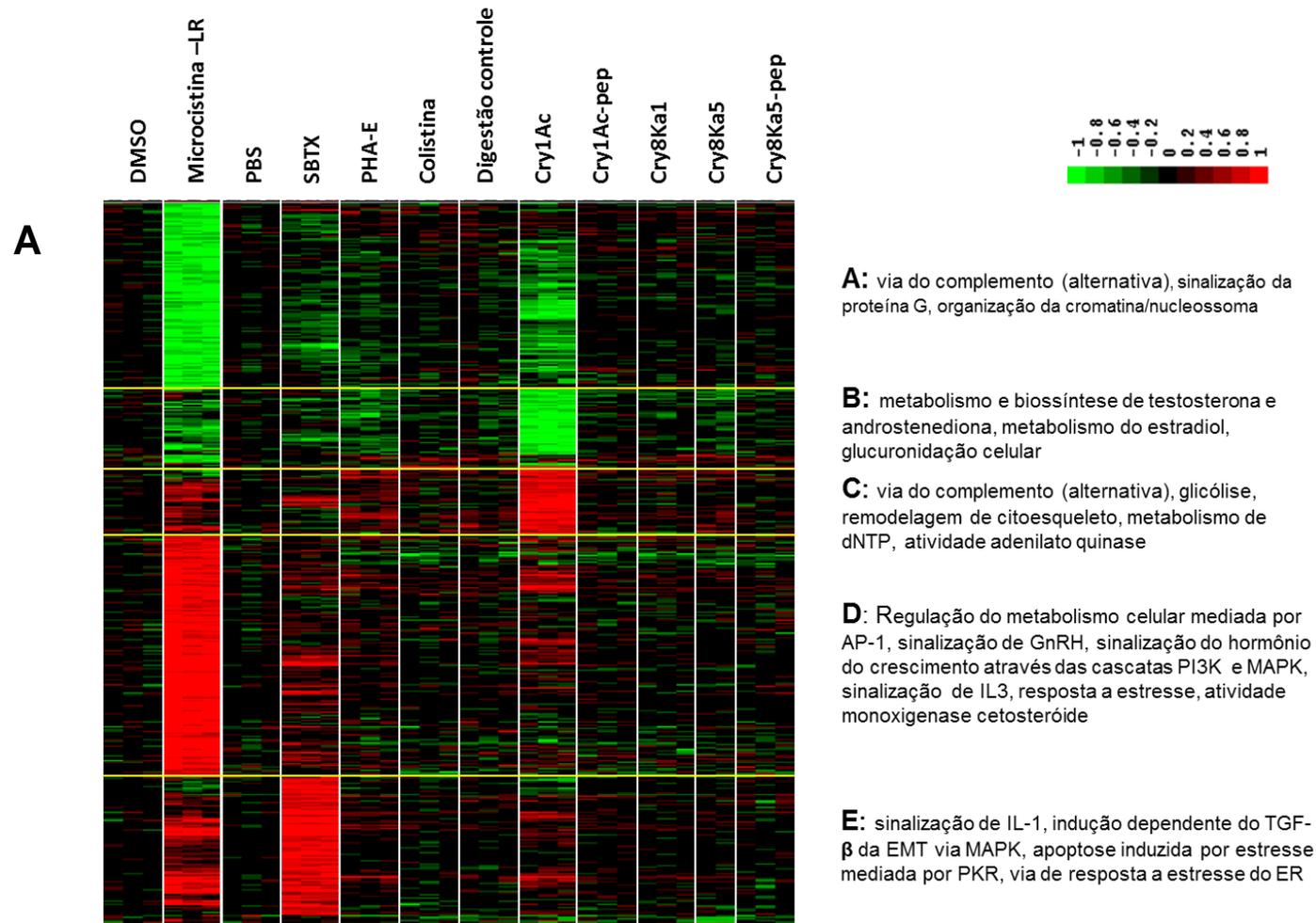
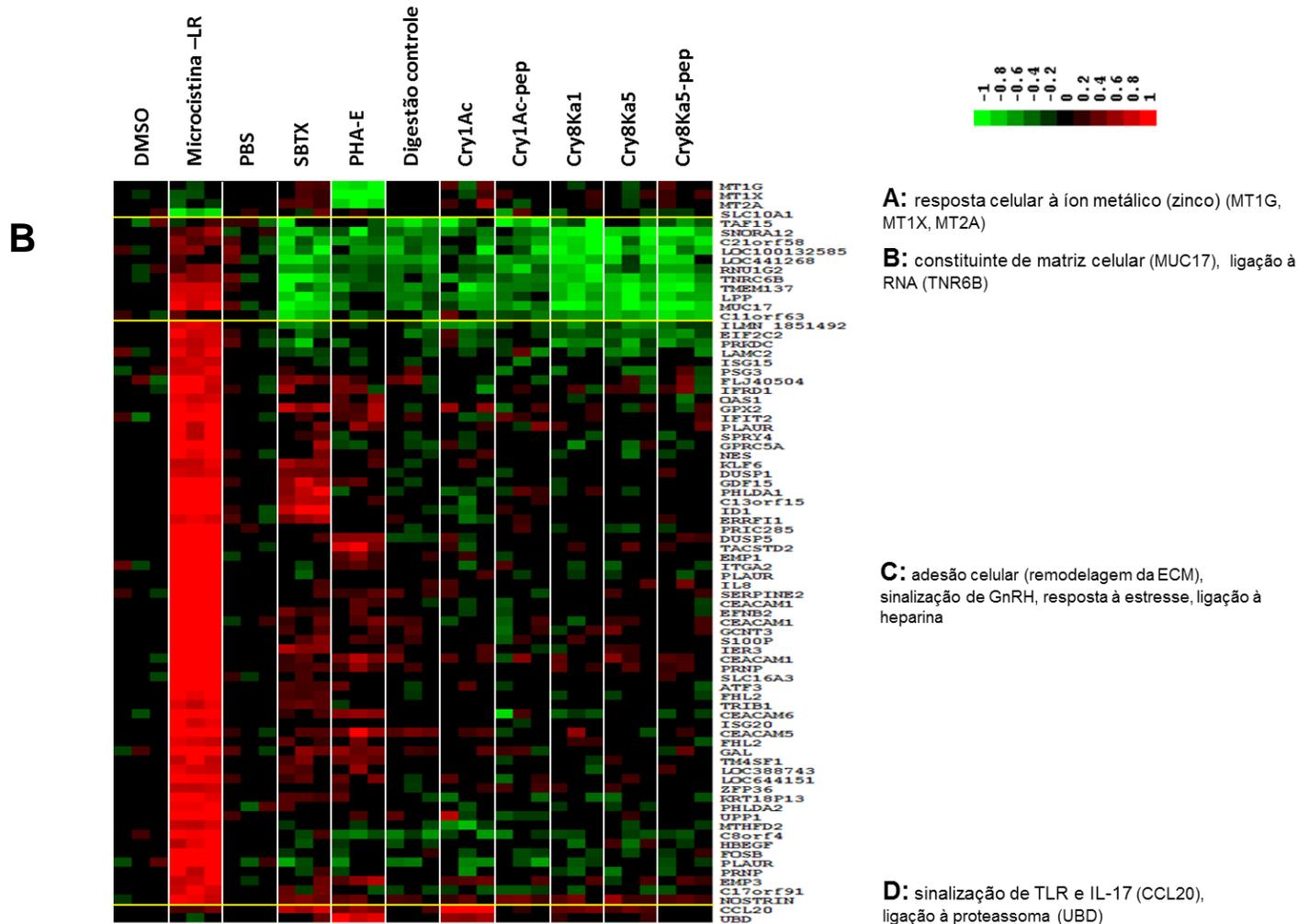


Figura 4.4 (CONCLUSÃO) - Mapas de expressão (“heat-maps”) mostrando os genes expressos diferencialmente em células MCF-7 (A) e células diferenciadas Caco-2 (B) após tratamento por 24 h com Cry8Ka5, Cry1Ac, Cry1Ac-pep, Cry8Ka5-pep e demais proteínas/peptídeos controle. Genes regulados > 1,62 vezes para cima ou para baixo, regulados em, pelos menos, duas das três repetições foram selecionados e não afetados > 1,41 nos arranjos dos veículos (DMSO e PBS). Verde - representa regulação para baixo; preto - nenhuma mudança; e, vermelho - regulação para cima. A intensidade da cor relacionada com a proporção de 2log de regulação para cima ou para baixo é indicada pela barra. No mapa de MCF-7, 5 grupos de padrões de expressão de gene (A - E) podem ser distinguidos, enquanto para Caco-2, são 4 agrupamentos de genes (A - D). Caminhos ou processos biológicos para os quais genes estão super-representados em agrupamentos foram definidos de acordo com análise no MetaCore



5.6 Análises de Mapa Conectivo dos dados de MCF-7

Para verificar se as amostras que causaram os efeitos mais proeminentes nos perfis de expressão de genes das células MCF7 atuaram de forma semelhante a drogas já conhecidas, foi feita uma conexão das assinaturas de expressão da microcistina, Cry1Ac e SBTX com aquelas da base de dados Mapa Conectivo (Connectivity Map), utilizando o algoritmo de busca desse programa. Para tanto, os genes que foram significativamente regulados para cima e para baixo pelos três compostos (TABELA 4.2) foram carregados na referida base de dados, o que resultou em escores de conectividade. As drogas top-10 que apresentaram os escores mais altos de conectividade nos três tratamentos foram selecionados e a classificação de um medicamento específico em um tratamento foi comparado a sua própria classificação nos outros dois tratamentos (TABELA 4.3).

Em geral, uma proporção significativamente alta dos mapas conectivos estavam positivamente correlacionados com um composto (a proteína ou peptídeo), também foram positiva- ou negativamente correlacionados com os outros dois compostos. Uma exceção foi à baixa correlação encontrada entre Cry1Ac e SBTX (ver probabilidades hipergeométricas na Tabela 4.3). A título de ilustração, a partir dos 10 casos com a maior correlação com a Cry1Ac, 3 e 8 casos estavam entre os 100 mais correlacionados a SBTX ($P = 0,03$) e microcistina ($P = 10^{-8}$), respectivamente. Dos 10 casos com a maior correlação com a SBTX, 1 e 7 casos estavam entre os 100 casos mais correlacionados a Cry1Ac ($P = 0,37$) e microcistina ($P = 10^{-8}$), respectivamente

Cry1Ac apresentou uma alta correlação positiva com o ciclopirox, agente antifúngico sintético, e com os ionóforos ionomicina e lasalocida. Microcistina mostrou uma alta correlação positiva com fármacos utilizados como vasodilatadores, tais como suloctidil (classificado na posição 1), fenoxibenzamina (posição 4) e prenilamina (posição 5). SBTX mostrou uma alta correlação positiva com o número de fármacos que inibem a síntese de proteínas (licorina, anisomicina, ciclo-heximida) ou induzem estresse via ER (tapsigargina).

Tabela 4.3 – Dados do Mapa Conectivo obtido a partir das assinaturas de expressão das proteínas/peptídeos Cry1Ac, microcistina-LR e SBTX em células MCF-7

Amostra	Drogas Top-10*	Correlação		
		Microcistina	SBTX	
Cry1Ac	1	5109870	31[#]	68
	2	Ciclopirox	94	123
	3	Ionicina	50	119
	4	Lasalocide	65	499
	5	Dipridamol	165	1.109
	6	15-deltaprostaglandina J2	2	94
	7	Colchicina	41	178
	8	Witaferina A	6	150
	9	Dipivrefina	582	972
	10	Fenoxibenzamina	4	75
	Nº de casos no top-100	8	3	
	Probabilidade hipergeométrica [†]	P = 10 ⁻⁸	P = 0,03	
Microcistina			Cry1Ac	SBTX
	1	Suloctidil	224	10
	2	15-deltaprostaglandina J2	6	94
	3	Celastrol	157	37
	4	Fenoxibenzamina	10	75
	5	Prenilamina	56	9
	6	Witaferina A	8	150

Tabela 4.3 (CONCLUSÃO) – Dados do Mapa Conectivo obtido a partir das assinaturas de expressão das proteínas/peptídeos microcistina-LR, Cry1Ac e SBTX em células MCF-7

Amostra	Drogas Top-10	Correlação		
		Cry1Ac	SBTX	
Microcistina	7	Niclosamida	102	56
	8	Pyrvinium	35	49
	9	Terfenadina	64	34
	10	Bepiridil	271	76
		Nº de casos no top-100	6	9
		Probabilidade hipergeométrica	$P = 3 \times 10^{-5}$	$P = 6 \times 10^{-10}$
SBTX			Cry1Ac	Microcistina
	1	Licorina	1131	72
	2	Anisomicina	1026	21
	3	Cicloheximida	286	172
	4	Tapsigargina	244	56
	5	Emetina	142	152
	6	Puromicina	429	24
	7	Cefaelina	736	167
	8	Ivermectina	135	12
	9	Prenilamina	56	5
	10	Suloctidil	224	1
	Nº de casos no top-100	1	7	
	Probabilidade hipergeométrica	$P = 0,37$	$P = 10^{-5}$	

*Maior correlação positiva;

#Números em negrito indicam a classificação da droga dentro do top-100 (de 1.309 casos);

†Valores de P são baseados em distribuição hipergeométrica.

5.7 GSEA

GSEA foi outra abordagem utilizada para identificar vias ou processos biológicos afetados pelas proteínas/peptídeos (10 tratamentos diferentes) em células MCF-7. Conjuntos de genes foram retirados da coleção gênica BioCarta. No total, 93 conjuntos de genes foram encontrados como sendo significativamente afetados por, pelo menos, um dos 10 tratamentos (FIGURA 4.5). A maioria dos efeitos foi observada para microcistina, SBTX e Cry1Ac. Na exposição aos peptídeos de Cry1Ac, quase nenhum efeito sobre a expressão gênica associada às vias ou processos biológicos pode ser observado.

Algumas vias, incluindo a cascata de sinalização ATM, foram afetadas por todos os três compostos, enquanto que outras vias, tais como glicólise, via TNFR2 e via ARENRF2 foram afetadas por apenas um ou dois dos compostos (FIGURA 4.5). GSEA permite também analisar em pormenores os níveis de expressão gênica de genes individuais em um conjunto de genes. Uma mapa de expressão do conjunto de genes BioCarta da via ATM mostra que alguns genes, tais como GADD45 e CDKN1A (p21 CIP1), foram regulados para cima em todos os três tratamentos (FIGURA 4.6 A). Outro gene relevante nessa via, Jun, foi regulado para cima por microcistina e SBTX, mas a sua expressão foi pouco afetada pelos Cry1Ac.

Uma bateria de genes que codificam enzimas envolvidas na glicólise, incluindo hexoquinase 1 (HK1), glucose-6-fosfato isomerase (GPI), fosfofrutoquinase (PFKL), triose fosfato isomerase (TPI1), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fosfogliceratoquinase 1 (PGK1), fosfoglicerato mutase 1 (PGAM1) e enolase 1 (ENO1) foram reguladas para cima pelo tratamento com Cry1Ac, em particular (FIGURA 4.6. B).

A via TNFR2 com genes, tais como DUSP1 e RELA, foi regulada para cima, em especial, pela microcistina e SBTX, mas alguns genes (TNFAIP3, NFKBIA) também foram regulados pela Cry1Ac.

A via BioCarta ARENRF2 foi afetada pela microcistina. Genes que codificam JUN, FOS, MAPK1, e vários tipos de MAF foram regulados para cima em células MCF-7 expostas a microcistina.

Figura 4.5 – Análises de enriquecimento de genes (GSEA) dos dados de microarranjos de células MCF-7 tratadas por 24 h com Cry8Ka5, Cry1Ac, Cry8Ka5-pep, Cry1Ac-pep e demais proteínas/peptídeos controle. Mapa de expressão (“heat-map”) mostrando os agrupamentos de genes do banco de dados BioCarta que foram significativamente regulados pelos vários tratamentos (como encontrado pelo GSEA). Verde - representa regulação para baixo; preto - nenhuma mudança; e, vermelho - regulação para cima. Microcystin = microcistina; colistin = colistina; digestion control = digestão controle; Cry1Ac peptides = Cry1Ac-pep; Cry8Ka5 peptides = Cry8Ka5-pep

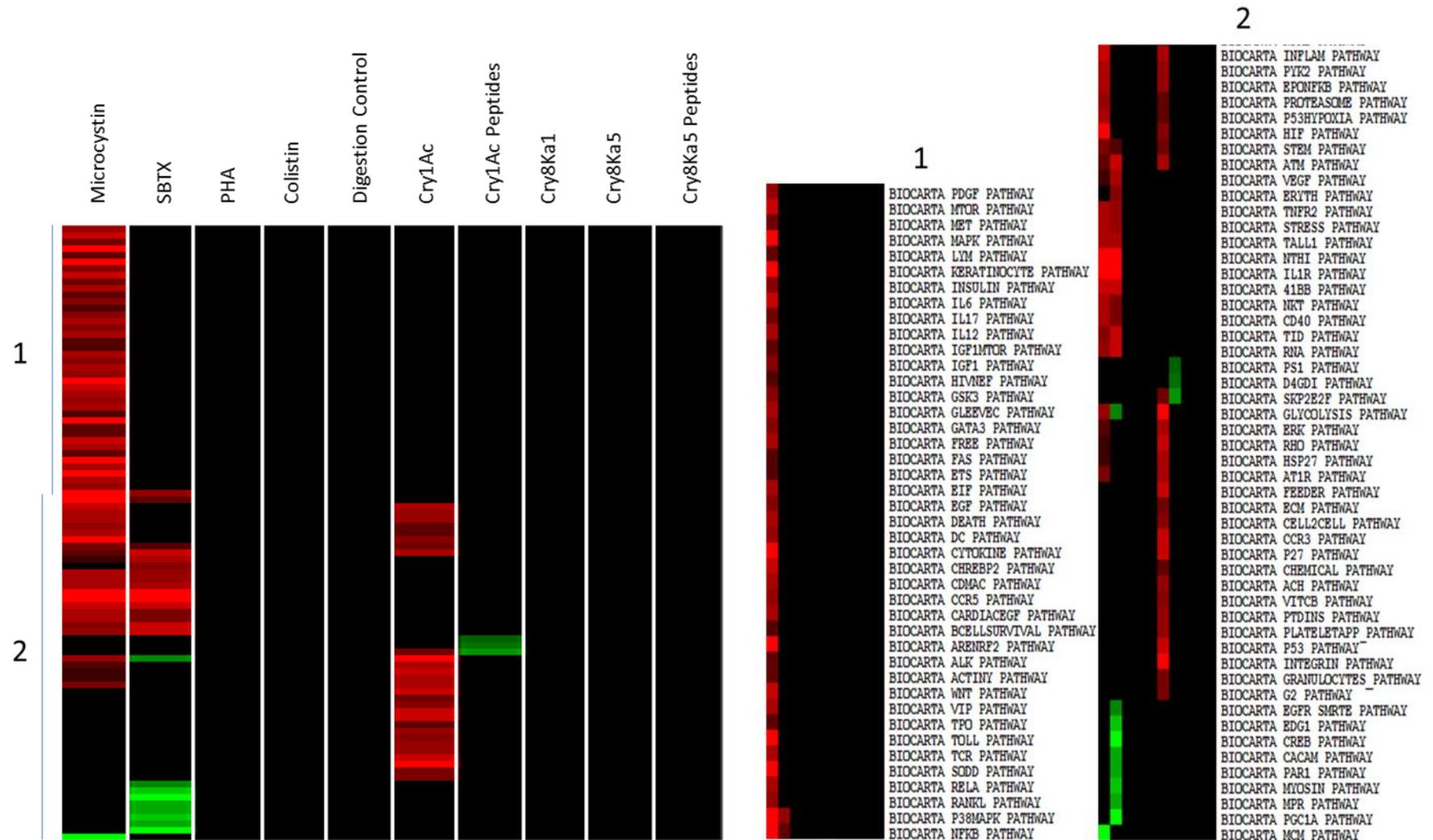
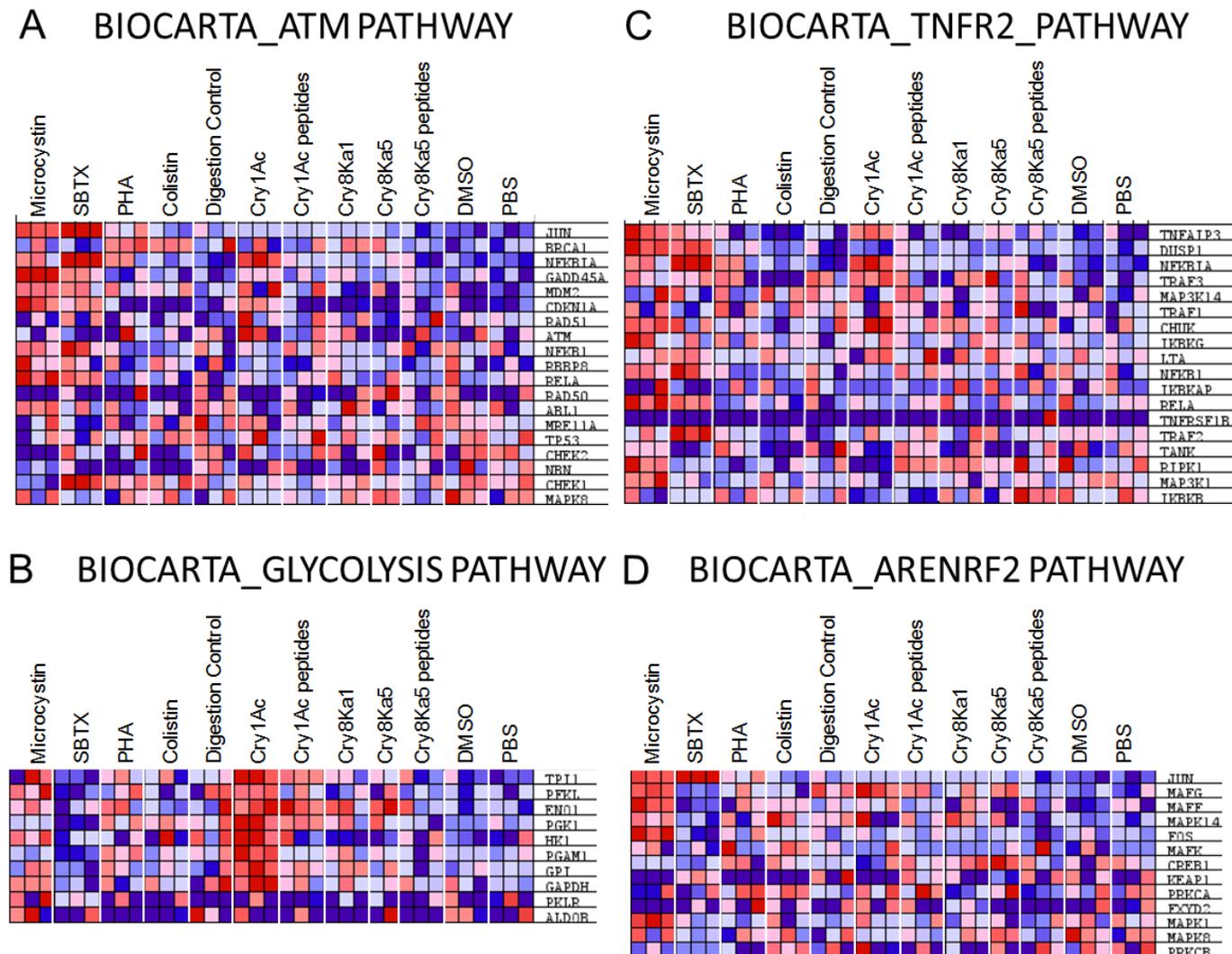


Figura 4.6 – Expressão de genes pertencentes a agrupamentos de gene da base de dados como determinado pelo GSEA. Células MCF-7 tratadas por 24 h com proteínas e peptídeos, em especial, microcistina, Cry1Ac e SBTX mostraram expressão diferencial e genes envolvidos na (A) via do ATM, (B) glicólise, (C) via TNFR2, e (D) via ARENRF2. Para cada gene, o tratamento com a mais elevada expressão apresenta o vermelho mais intenso, enquanto o tratamento com a mais baixa expressão apresenta a cor azul mais intensa



6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi proposta uma abordagem toxicogenômica comparativa como uma etapa adicional na avaliação de biossegurança alimentar das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, além de verificar a adequação dessa metodologia para avaliação da segurança de consumo de novas proteínas recombinantes. Para tanto, as linhagens de células de carcinoma de mama MCF-7 e de carcinoma de cólon Caco-2, ambas de origem humana, foram expostas *in vitro* a proteína mutante Cry8Ka5, a sua parental Cry8Ka1 e a, já bem estudada, Cry1Ac. A razão para escolha da linhagem de células de mama MCF-7 para os ensaios de exposição às proteínas/peptídeos reside no fato de que existem bancos de dados disponíveis publicamente na Internet com vasta quantidade de dados de transcriptômica dessas células acerca de vias e processos biológicos, onde é possível fazer comparações através de algoritmos de pesquisa apropriados com dados provenientes de estudos de expressão gênica utilizando essa mesma linhagem (LAMB *et al.*, 2006). As células Caco-2 diferenciadas são conhecidas por apresentarem várias características semelhantes àquelas dos enterócitos do epitélio do intestino delgado, que, por sua vez, são um dos principais alvos dos compostos alimentares após a ingestão. Para fins comparativos, ambas as linhagens celulares foram também expostas a uma série de proteínas (SBTX, PHA-E) e peptídeos (microcistina-LR, colistina) bioativos. Para examinar se a digestão no trato gastrointestinal poderia afetar os possíveis efeitos das proteínas *Bt*, as células foram também expostas a um “pool” de peptídeos de Cry8Ka5 (Cry8Ka5-pep) e de Cry1Ac (Cry1Ac-pep) obtidos por digestão sequencial *in vitro*. As células foram expostas a concentrações não citotóxicas das proteínas/peptídeos e, subsequentemente, submetidas a análises do perfil de expressão de genes utilizando microarranjos de DNA.

Pelo que consta, apenas um estudo de citotoxicidade *in vitro* de toxinas *Bt* sobre células humanas foi publicado (MESNAGE *et al.*, 2012). Neste estudo, a linhagem celular de rim embrionário HEK293 foi exposta a concentrações crescentes de Cry1Ab e Cry1Ac, e avaliadas quanto a sua citotoxicidade utilizando o ensaio de liberação de adenilato-quinase (AK) após lise celular e a atividade da succinato desidrogenase mitocondrial (ensaio do MTT). Concentrações de até 100 ng/mL de Cry1Ac não mostraram quaisquer efeitos citotóxicos, enquanto a exposição a 100 µg/mL de Cry1Ab resultou em morte celular significativa. No presente estudo, em que a viabilidade das células MCF-7 e Caco-2, ambas indiferenciadas, foi medida utilizando os níveis de ATP como parâmetro, uma concentração de até 244,5 µg/mL das proteínas Cry8Ka5, Cry8Ka1, Cry1Ac e das amostras de peptídeos

Cry8Ka5-pep e Cry1Ac-pep não reduziu a viabilidade celular de ambas linhagens de forma acentuada (viabilidade celular > 80%). Dessa forma, foi escolhida a concentração de 100 µg/mL para os testes de exposição das células MCF-7 indiferenciadas e Caco-2 diferenciadas às amostras de proteínas/peptídeos por tratar-se de uma amostra de fácil preparação (sem dificuldade para solubilização) e por ainda apresentar uma margem de segurança de mais de 10 vezes quando comparada à concentração tóxica para o bicudo. As proteínas controle não-Cry de alta massa molecular, SBTX e PHA-E, também foram utilizadas na concentração de 100 µg/mL, enquanto os peptídeos colistina e microcistina foram utilizados nas concentrações de 1 e 25 µg/mL. Colistina não foi utilizada no ensaio de exposição com Caco-2.

As análises dos dados dos microarranjos revelaram que dentre as proteínas Cry e suas amostras de peptídeos estudadas, o que inclui a Cry8Ka5 e Cry8Ka5-pep, apenas a entomotoxina íntegra Cry1Ac teve um efeito significativo sobre o perfil de expressão gênica. Contudo, esse efeito foi observado somente nas células MCF-7, enquanto nas células diferenciadas Caco-2 não foi detectado qualquer efeito relevante. É importante notar que a amostra Cry1Ac-pep (obtido da digestão sequencial *in vitro* da Cry1Ac) não afetou a expressão de genes em células MCF-7, indicando que a digestão de Cry1Ac com pepsina e tripsina (como ocorre também no trato gastrointestinal) resultou em perda de atividade. Esses resultados são extremamente positivos para a proteína alvo deste estudo, Cry8Ka5, pois reforçam o caráter inócuo dessa proteína no que diz respeito a sua biossegurança alimentar, corroborando com dados encontrados nos capítulos anteriores. Vale ressaltar, que análises de mudanças no perfil de expressão gênica de cultura de células são avaliações muito sensíveis, o que só reitera a ausência de riscos potenciais inerentes a Cry8Ka5. Apesar da Cry1Ac ter apresentado efeitos pronunciados sobre MCF-7, isso não seria tão relevante uma vez que o processo digestório de monogástricos e, provavelmente, de ruminantes debelaria qualquer atividade como mostrado. Contudo, isso pode ter alguma relevância quando se aborda a segurança de ingestão dessa proteína por crianças, que se sabe ter o trato gastrointestinal ainda em desenvolvimento. Ainda neste contexto, é importante ressaltar que a amostra de Cry1Ac utilizada possuía em média 30% de contaminantes de origem bacteriana, que potencialmente podem ter contribuído para as mudanças observadas na expressão gênica. A razão para os contaminantes não terem apresentado quaisquer efeitos associados à amostra Cry1Ac-pep poderia estar relacionado ao fato de que durante a obtenção desse “pool” de peptídeos são feitas duas diálises que podem ter reduzido drasticamente a concentração dos produtos bacterianos. Assim, um novo ensaio de exposição de células MCF-7 com uma nova amostra de Cry1Ac com um melhor índice de pureza (> 90%) e com o produto da expressão do vetor

vazio (cassete sem o gene *cry1Ac*) já está sendo realizado para confirmar todos os achados. Independente de qualquer dúvida que permeie os resultados encontrados para a Cry1Ac, fica claro que a abordagem toxicogenômica comparativa proposta para avaliar a biossegurança de proteínas recombinantes mostrou-se bastante sensível para detectar quaisquer efeitos adversos de amostras proteicas a cultura de células humanas.

Além da proteína Cry1Ac, os controles não-Cry, microcistina e SBTX, também causaram alterações significativas no transcriptoma das células MCF-7. Com respeito às células Caco-2 apenas microcistina afetou substancialmente a expressão de genes. Em geral, a exposição das células Caco-2 resultou em um número menor de genes diferencialmente expressos de forma significativa ($p < 0,01$), quando comparada com a exposição das células MCF-7. Isto pode ser explicado, não só pela origem diferente das duas linhagens de células, uma de mama e outra de intestino, mas também pelas diferenças no estado proliferativo, ou seja, células MCF-7 estavam em plena proliferação, enquanto as células Caco-2 já estavam diferenciadas no momento da exposição às amostras. Além disso, no caso de células Caco-2, uma grande variação no perfil de expressão de genes foi encontrada entre as três repetições de um tratamento particular. Alguns genes foram afetados em uma das réplicas, mas não nos outros, e, portanto, não satisfizeram aos critérios para a seleção. Esta variação pode ter sido devido ao desenho experimental feito para os ensaios de exposição com Caco-2. Em três experimentos independentes, as células Caco-2 foram permitidas diferenciar durante 21 dias e, então, foram expostas a esses compostos. No estudo de exposição com células MCF-7, que também foi realizado em três experimentos independentes, as células foram tratadas com as proteínas e peptídeos, após 3 dias de cultura, o que diminui a variação entre os experimentos independentes e as réplicas de cada experimento individual. Assim, embora cultura de células Caco-2 diferenciadas seja um modelo amplamente utilizado para investigação de efeitos relacionados a alimentos, essa variação deve ser tratada com cautela quando se usa esse modelo para estudos de expressão de genes.

Apesar da proteína Cry8Ka5 e sua amostra de peptídeos Cry8Ka5-pep não terem apresentado qualquer efeito significativo sobre a expressão gênica de MCF-7 e Caco-2, foi dado prosseguimento a análises dos dados dos microarranjos de MCF-7 tratada com Cry1Ac.

A interpretação biológica dos dados dos microarranjos de MCF-7 indicou que Cry1Ac, microcistina e SBTX afetaram várias vias e processos biológicos. A análise via MetaCore revelou que Cry1Ac aumentou a expressão de genes envolvidos na via do complemento (alternativa) (C5 convertase, Fator Ba, Fator Bb), na glicólise (ENO2), na remodelação do citoesqueleto (β -tubulina) e na atividade da adenilato-quinase (AK3), e, ainda,

diminui a expressão de genes relacionados à glucuronidação celular (UGT2B15, UGT2B17) e em processos no qual a glucuronidação desempenha um papel, tais como a biossíntese/metabolismo de hormônios esteróides. GSEA mostrou claramente que a Cry1Ac não regula apenas o gene ENO2, mas muitos outros envolvidos na glicólise. Isso demonstra o valor adicional de se realizar o GSEA, além do MetaCore, para análise da expressão de genes ao nível de via. Esse aumento na glicólise é conhecido como o efeito de Warburg, que é um processo frequentemente observado em células cancerosas que produzem energia predominantemente em altas taxas pela glicólise seguido de fermentação do ácido láctico. Isto é o oposto do que acontece em células normais que têm uma taxa relativamente baixa de glicólise, seguida de oxidação do piruvato no ciclo de Krebs. Além disso, a análise do Mapa Conectivo mostrou uma alta correlação positiva de Cry1Ac com o ciclopirox, um agente antifúngico sintético. Ciclopirox é conhecido por ser um indutor do inibidor de p21 (CIP1) da cinase dependente de ciclina (CDK), que está envolvido na parada do ciclo celular na fase G1/S (ZHOU et al., 2010). O gene que codifica a p21 (CIP1), também denominado CDKNA1, verificou-se ser regulado para cima pela Cry1Ac. Com base nesses resultados, pode-se supor que Cry1Ac induz a uma parada do ciclo celular que, por sua vez, inibi a proliferação das células MCF-7. Outro fato interessante é que a Cry1Ac regulou para cima, em MCF-7, genes (C5 convertase, Fator Ba, Fator Bb) da via do complemento alternativa que, por sua vez, estão envolvidos na resposta imune inata, especialmente contra agentes infecciosos tais como microrganismos. Dessa forma, é possível acreditar que as células reconheceram a presença de produtos de origem bacteriana, como é o caso da proteína Cry1Ac de *Bt*, e desencadearam seus mecanismos de defesa inata. Já foi relatado na literatura que Cry1Ac é altamente imunogênica por via oral em camundongos, mas nesse caso foi mediada por anticorpos, demonstrando a presença de determinantes imunogênicos em Cry1Ac (VÁSQUEZ-PADRÒN et al., 2000a). Provavelmente, esses potenciais determinantes imunogênicos de Cry1Ac são pouco comuns, uma vez que, estudos de bioinformática, inclusive aqueles mostrados no Capítulo 2, não demonstraram similaridade relevante entre a sequência dessa entomotoxina com proteínas alergênicas. Certamente, esse tópico merece estudos posteriores utilizando metodologias diferentes para avaliar o potencial imunogênico da Cry1Ac.

A exposição de células MCF-7 a microcistina resultou na regulação para cima de genes relacionados à regulação do metabolismo celular mediado por AP-1, na sinalização de GnRH, sinalização de MAPK e PI3K/AKT, sinalização de IL-3 e resposta ao estresse, enquanto regulou para baixo genes envolvidos na via do complemento, sinalização da

proteína G e na organização da cromatina/nucleossoma. A regulação negativa da via do complemento foi devido à diminuição da expressão de componentes do complemento, C5a e C5b, por sua vez, genes diferentes daqueles regulados para cima na via do complemento em células MCF-7 tratadas com Cry1Ac (ver acima). Um exame mais aprofundado das vias reguladas para cima pela microcistina mostrou que a maioria delas pertence a um conjunto de genes comuns, ou seja, genes que funcionam na interseção entre as vias, tais como Jun e Fos. Dentre todas as vias afetadas pela microcistina em células MCF-7, apenas a regulação para cima da sinalização de GnRH foi encontrada também em células Caco-2 tratadas com o mesmo peptídeo. BOTHA *et al.* (2004) demonstraram que microcistina-LR induz apoptose e estresse oxidativo em culturas de células Caco-2. Por sua vez, esses resultados vão ao encontro dos resultados encontrados neste trabalho, pois é sabido que as vias MAPK e PI3K/AKT tem papel central no crescimento, proliferação e mecanismos antiapoptóticos, promovendo sobrevivência em células normais e neoplásicas (MENDELSON; BASELGA, 2003; OBATA; BROWN; YAFFE, 2000).

A exposição de células MCF-7 à SBTX resultou na regulação para cima de genes envolvidos em vários processos, tais como na sinalização de IL-1, transição epitelial-mesenquimal e resposta ao estresse via retículo endoplasmático (ER). Como foi o caso para microcistina, um número razoável de genes (por exemplo, c-Jun, endotelina-1, ATF-4, I-kB) foi compartilhado por várias vias. Na análise do Mapa Conectivo dos dados de expressão de MCF-7, SBTX mostrou uma alta correlação positiva com fármacos que inibem a síntese de proteínas e/ou induzem estresses via ER. Licorina que é um alcalóide tóxico encontrado em várias espécies de *Amaryllidaceae* inibe a síntese proteica. Anisomicina e cicloheximida são antibióticos produzidos por *Streptomyces griseolus* e são conhecidos por inibir a síntese de proteínas, interferindo com o alongamento (inibição de peptidil-transferase), e passos de translocação na síntese de proteínas, respectivamente. Anisomicina pode desencadear uma resposta a estresse ribotóxico que ativa cascatas de proteína quinase ativadas por estresse (p38, JNK), induzindo a apoptose. Tapsigargina, um composto isolado da planta *Thapsia garganica*, é um inibidor de enzimas Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco-endoplasmático (SERCA), induzindo estresse via ER (PUTHKALATH *et al.*, 2007). Morais (2010) analisou o perfil de expressão gênica através de microarranjos de DNA de células de *C. albicans* expostas à concentração de 200 µg/mL de SBTX, onde detectou superexpressão de vários genes, dentre esses, genes relacionados à resposta a estresse. Contudo, esses genes relacionados a estresse não foram os mesmos detectados para a resposta das células MCF-7

tratadas com SBTX. Por fim, os resultados encontrados sugerem que SBTX é um inibidor da síntese de proteínas e, possivelmente, um indutor de estresse via ER.

7 CONCLUSÃO

A abordagem toxicogenômica comparativa utilizada no presente estudo revelou que a proteína mutante Cry8Ka5 e sua amostra de peptídeos, Cry8Ka5-pep (obtida por digestão sequencial *in vitro*), não causaram qualquer efeito sobre a expressão gênica de células de carcinoma de mama MCF-7 e de células de carcinoma de cólon Caco-2 diferenciadas, consideradas um modelo de epitélio de intestino humano. Por outro lado, a proteína Cry1Ac íntegra causou efeitos significativos na regulação de genes de MCF-7, estando os efeitos detectados relacionados a interferências sobre o ciclo celular e inibição da proliferação. Contudo, esses efeitos foram eficientemente debelados pela digestão *in vitro* dessa proteína.

Ao mesmo tempo, este estudo também permitiu uma visão dos efeitos e elucidação dos mecanismos de ação de outras proteínas e peptídeos bioativos utilizados como controle experimentais, tais como a SBTX (a toxina da soja) e da micricistina-LR (um peptídeo tóxico de cianobactéria), indicando o valor e a funcionalidade da abordagem empregada na avaliação da biossegurança alimentar de novas proteínas e peptídeos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fim de sumarizar e, ao mesmo tempo, ponderar os principais resultados positivos e negativos detectados ao longo dos três últimos capítulos em que foi avaliada a biossegurança alimentar das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac, serão apresentadas algumas considerações finais a seguir.

No Capítulo 2, em que a proteína Cry8Ka5 foi avaliada quanto a sua segurança para o consumo de humanos e animais de acordo com os métodos oficiais arranjados numa avaliação baseada em pesos de evidência, a proteína em questão atendeu a todas as exigências legais para eventual aprovação de um novo algodão *Bt* portando o gene *cry8Ka5* no que diz respeito à biossegurança alimentar dos produtos de expressão exógenos de uma planta GM. Apesar da pesquisa *in silico* de sítios de N-glicosilação não fazer parte da avaliação oficial de biossegurança alimentar, esse teste foi realizado e mostrou que a Cry8Ka5 possui um sítio potencial. No entanto, a veracidade desse achado para a Cry8Ka5 deve ser primeiro confirmada através de teste *in vitro*, bem como modelos estruturais adicionais dessa molécula podem contribuir para tal fim. Outro ponto importante é a caracterização dos transformantes, ou seja, das plantas de algodão portando o cassete contendo o gene *cry8Ka5* no que concerne ao(s) local(is) de inserção do mesmo no genoma da(s) planta(s), pois dependendo da localização onde esta proteína será expressa, ela potencialmente poderá ser N-glicosilada. No decorrer do referido capítulo, a proteína Cry1Ac foi utilizada como controle proteico, uma vez que a abordagem utilizada já havia sido utilizada algumas vezes para essa proteína.

Já no Capítulo 3, as proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac foram avaliadas quanto aos seus efeitos cito- e genotóxicos sobre células de mamíferos, bem como sobre o crescimento de algumas leveduras e bactérias a fim de avaliar potenciais efeitos dessas proteínas sobre a microbiota intestinal. Em linhas gerais, as proteínas não causaram cito- ou genotoxicidade considerável, mesmo quando testadas em altas doses e em diferentes metodologias, além de não apresentar atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Na MFA, a Cry8Ka5 causou alterações na topografia da membrana celular de eritrócitos humanos tipo O. Contudo, novos testes em concentrações menores (mais próximas de situações reais) e com maiores tempos de exposição devem ser realizados para avaliar a relevância das alterações detectadas. É importante ressaltar também que os métodos complementares realizados no referido capítulo forneceram informações valiosas à avaliação de biossegurança alimentar da proteína Cry8Ka5 e da Cry1Ac, sendo, portanto, passíveis de serem utilizados para testes com novas proteínas.

No Capítulo 4 foi utilizada uma abordagem toxicogenômica comparativa para avaliar os efeitos das proteínas Cry8Ka5 e Cry1Ac e de suas amostras de peptídeos obtidas por digestão sequencial *in vitro* sobre o perfil de expressão gênica de linhagens de células humanas, incluindo células diferenciadas Caco-2. Esse estudo não detectou qualquer efeito relevante sobre a expressão gênica das células MCF-7 e Caco-2 relacionado à exposição a Cry8Ka5 e a amostra de peptídeos. Por sua vez, a proteína Cry1Ac causou efeitos significativos na regulação de genes de MCF-7. Contudo, esse resultado não teria grande relevância em uma situação real de ingestão dessa proteína, pois a mesma não repetiu a ação sobre as células após ser submetida à digestão *in vitro*. Ao mesmo tempo, o desenho experimental proposto também permitiu uma visão dos efeitos e elucidação dos mecanismos de ação de outras proteínas e peptídeos bioativos utilizados como controle experimentais, indicando o valor preditivo e a funcionalidade da abordagem empregada na avaliação da biossegurança alimentar de novas proteínas e peptídeos.

Após tudo o que foi exposto, é possível concluir que não é esperado qualquer risco relevante associado ao consumo da proteína Cry8Ka5, sendo, também, confirmado a partir de novas abordagens em biossegurança o caráter inócuo da proteína Cry1Ac.

REFERÊNCIAS

- AALBERSE, R. C. Structural biology of allergens. **J Allergy Clin Immunol** 106 (2):228-38, aug. 2000.
- ABÉCASSIS, V.; POMPON, D.; TRUAN, G. High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and *in vivo* DNA recombination in yeast: statistical analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 20, p. e88. 2000.
- ACEY, R. A. *et al.* A butyrylcholinesterase in the early development of the brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: A target for phthalate ester embryotoxicity? **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 299, p. 659–662. 2002.
- ALCANTARA, E. *et al.* Monitoring Cry1Ab susceptibility in Asian corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on *Bt* corn in the Philippines. **Crop Prot.**, v. 30, p. 554–559. 2011.
- AL-WESALI, M. *et al.* The influence of pea seed trypsin inhibitors on the *in vitro* digestibility of casein. **J. Sci. Food Agric.**, v. 68, n. 4, p. 431-437. 1995.
- AN, J. *et al.* Vip3Aa tolerance response of *Helicoverpa armigera* populations from a Cry1Ac cotton planting region. **J. Econ. Entomol.**, v. 103, n. 6, p. 2169-73. 2010.
- ANDRIS-WIDHOPF, J. *et al.* Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. **J. Immunol. Meth.**, v. 242, p. 159-181. 2000.
- ARAÚJO, A. E. *et al.* Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar. **Embrapa Algodão Sistemas de Produção**. Jan/2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/index.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO (ABRAPA). **A cadeia do algodão brasileiro: desafios e estratégias**. Biênio 2011/2012. 85p, 2012a.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO (ABRAPA). **Área, produção e produtividade**. 2012b. Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/area-producao-productividade-brasil.aspx>>. Acesso em: 06 nov. 2012.
- ASTWOOD, J. D.; FUCHS, R. L. Allergenicity of foods derived from transgenic plants. **Monogr. Allergy** 32, 105-120, 1996.
- ATHERTON, K. T. Safety assessment of genetically modified crops. **Toxicology**, v. 27, p. 181-182:421-6, dec. 2002.
- BAGLA, P. Hardy cotton-munching pests are latest blow to GM crops. **Science**, v. 327, p. 14-39. 2010.

- BARAHONA, M. V.; SANCHEZ-FORTUN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environ. Pollut.**, v. 104, p. 469–476. 1999.
- BARTON, K. A.; WHITELEY, H. R.; YANG, N. S. *Bacillus thuringiensis* section sign-Endotoxin Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum* Provides Resistance to Lepidopteran Insects. **Plant Physiol.** (4):1103-9, dec. 1987.
- BELTRÃO, N. E. M. Algodão brasileiro em relação ao mundo: situação e perspectivas. *In*: BELTRÃO, N. E. M. (Org). **O Agronegócio do Algodão**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, v. 1, 1999. p. 17-27.
- BERNHEIMER, A. W. Assay of hemolytic toxins. **Meth. Enzimol.**, v. 165, p. 213-217, 1988.
- BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 32, n. 2, p. 156-73, oct. 2000.
- BONDZIO, A. *et al.* Impact of *Bacillus thuringiensis* toxin *CryIAb* on rumen epithelial cells (REC) - a new in vitro model for safety assessment of recombinant food compounds. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 6, p. 1976-84, jun. 2008.
- BOONSERM, P.; MO, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; LESCAR, J. Structure of the Functional Form of the Mosquito Larvicidal Cry4Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom Resolution. **J Bacteriol.** (9): 3391–3401, may. 2006.
- BOTHA, N. *et al.* The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. **Toxicon**, v. 43, n. 1, p. 85-92. 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRAND, G. D. *et al.* Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Anti- *Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 51, p. 49332-49340, 2002.
- BRAVO, A. *et al.* Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972. 1998.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action *Bacillus thuringiensis*: *Cry* and *Cyt* toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49, 423-435, 2007.
- BRÉVAULT, T. *et al.* Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry2Ab2 insecticidal proteins in four countries of the West African cotton belt. **J. Econ. Entomol.**, v. 102, n. 6, p. 2301-9, dec. 2009.
- BRODERICK, N.; RAFFA, F. K.; HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)** 103, 15196–15199, 2006.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. **GM Crops: Global Socioeconomic and Environmental Impacts 1996–2008**. Dorchester, UK: PG Economics Ltd, 2010.

BURGES, H. D. *Bacillus thuringiensis* in pest control: now and the future. **Pest Outlook**, v. 12, p. 90-97. 2001.

BURIM, R.V.; CANALLE, R.; LOPES, J. L.; VICHNEWSKI, W.; TAKAHASHI, C. S. Genotoxic action of the sesquiterpene lactone centratherin on mammalian cells in vitro and in vivo. **Teratog Carcinog Mutagen**. 21(6):383-93, 2001.

CALDWELL, G. S.; BENTLEY, M. G.; OLIVE, P. J. W. The use of brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. **Toxicon**, v. 42, p. 301–306. 2003.

CAO, B. *et al.* Safety assessment of dehydration-responsive element-binding (DREB) 4 protein expressed in *E. coli*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 11, p. 4077-84, nov. 2012.

CAO, S. *et al.* Safety assessment of Cry1C protein from genetically modified rice according to the national standards of PR China for a new food resource. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 58, n. 3, p. 474-81, dec. 2010.

CARPENTER, J. A. *et al.* **Comparative environmental impacts of biotechnology-derived and traditional soybean, corn and cotton crops**. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, IA: CAST, 2002.

CARRIERE, Y.; CROWDER, D. W.; TABASHNIK, B. E. Evolutionary ecology of insect adaptation to *Bt* crops. **Evol. Appl.**, v. 3, p. 561–573. 2010.

CARVALHO, A. F. U. *et al.* Preliminary assessment of the nutritional composition of underexploited wild legumes from semi-arid Caatinga and moist forest environments of northeastern Brazil. **J. Food Comp. Anal.**, v. 24, p. 487-93, jun-aug. 2011.

CHASSY, B. The history and future of GMOs in food and agriculture. **Cereal Foods World**, v. 52, n. 4, p. 169-17. 2007.

CHEEKE, P. R.; SHULL, L. R. Proteins and amino acids. *In*: CHEEKE, P. R.; SHULL, L. R. (Org.). **Natural Toxicants in Feed and Poisonous Plants**. Westport, CT: AVI Publishing Co, 1985. p. 235–291.

CHEN, M. *et al.* A critical assessment of the effects of bt transgenic plants on parasitoids. **PLoS One**, v.3, n. 5, p. e2284, may. 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. **Foods derived from modern biotechnology**. Rome, Italy, Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Second Edition. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/011/a1554e/a1554e00.htm>. Acesso em: 10 dez. 2012.

COHEN, M. B.; GOULD, F.; BENTUR, J. S. *Bt* rice: Practical steps to sustainable use. **Int. Rice Res. Notes**, v. 25, p. 4-10. 2000.

COLOMBO, M. L. *et al.* Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. **Farmaco**, v. 56, p. 403–409. 2001.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL E BIOSSEGURANÇA (CTNBio). **Aprovações comerciais**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12786.html>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL E BIOSSEGURANÇA (CTNBio). **Legislações**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php>>. Acesso em: 26 nov. 2012.

CONSTABLE, A. I. *et al.* ‘History of safe use’ as applied to the safety assessment of novel foods and foods derived from genetically modified organisms. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, p. 2513–2525. 2007.

COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. **Biossegurança de A a Z**. Imprensa: Rio de Janeiro, 2009, 262 p.

COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. **Entendendo a Biossegurança. Epistemologia e competências para a área de saúde**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Publit, 2012. 208p.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *J. Ethnopharmacol.*, v. 99, n. 1, p. 21-3013. 2005.

CRICKMORE, N. *et al.* Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 3, p. 807-13, sep. 1998.

DEGRANDE, P. E. **Bicudo do algodoeiro: táticas de controle para o Mato Grosso do Sul**. Dourados, MS: UFMS/NCA, 1991. 16p

DELANEY, B. *et al.* Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. **Food Chem. Toxicol.** v. 46, p. S71-S97. 2008.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved to colonize the insect world. **Trends Genetics**, v. 17, p. 193-199. 2001.

DE VENDÔMOIS, J. S. *et al.* Debate on GMOs health risks after statistical findings in regulatory tests. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 5, n. 6, suppl. 6, p. 590-8, oct. 2010.

DHURUA, S.; GUJAR, G. T. Field-evolved resistance to *Bt* toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. **Pest Manag. Sci.**, v. 67, p. 898–903. 2011.

DINIZ, M. F. F. M. *et al.* Padronização dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Camundongos *Swiss* e *Ratos Wistar*. **Rev. Bras. Ciênc. Saúde** v. 10, n. 2, p.171-176, 2006.

DOMINGO, J. L.; GINÉ BORDONABA, J. A literature review on the safety assessment of genetically modified plants. **Environ. Int.**, v. 37, n. 4, p. 734-42, may. 2011. Epub 2011 Feb 5.

DONALDSON, L.; MAY, R. **Health implications of genetically modified foods**. 1999. Disponível em: <http://www.biotech-info.net/gmfoods_health_implications.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2012.

DOWNES, S.; PARKER, T.; MAHON, R. Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab *Bt* toxin in Bollgard II cotton. **PLoS ONE**, v. 5, p. e12567. 2010.

DRYZGA, M. D. *et al.* Evaluation of the safety and nutritional equivalence of a genetically modified cottonseed meal in a 90-day dietary toxicity study in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, n. 10, p. 1994-2004, oct. 2007.

DU PONT. **The History of Biotechnology**. Disponível em: <http://www2.dupont.com/Biotechnology/en_US/intro/history.html>. Acesso em: 10 out. 2012.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1982. 217p.

EDMAN, P. Determination of amino acid sequences in protein. **Thromb. Diath. Haemorrhag. Suppl.**, v. 13, p. 17-20. 1964.

EISEN, M. B. *et al.* Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 25, p. 14863-8. dec. 1998.

EKINS, S. *et al.* Algorithms for network analysis in systems-ADME/Tox using the MetaCore and MetaDrug platforms. **Xenobiotica**, v. 36, n. 10-11, p. 877-901, oct-nov. 2006

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2010. Disponível em <<http://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 15 abr. 2010.

FAVILLA, M. *et al.* Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 1922–1931. 2006.

FEDERICI, B.; SIEGEL, J. Safety assessment of *Bacillus thuringiensis* and *Bt* crops used in insect control. In: HAMMOND, B.G (Ed). **Food safety of proteins in agricultural biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 45-102.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 47, p. 501–533. 2002.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J.; MACINTOSH, S. C. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). In: ROMEIS, J.; SHELTON, A. M. KENNEDY, G. G. (Eds.). **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs**. Dordrecht: Springer Science and Business Media, 2008.

FINAMORE, A. *et al.* Intestinal and peripheral immune response to MON810 maize ingestion in weaning and old mice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 10, n. 56, suppl. 23, p. 11533-9, dec. 2008.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. 3ª ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

FISCHHOFF, D. A. *et al.* Insect tolerant transgenic tomato plants. **Nat. Biotechnol.**, v. 5, p. 807–813. 1987.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Glossary**. 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 27 nov. 2012.

FU, T. J.; ABBOTT, U. R.; HATZOS, C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid—a comparative study. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 24, p. 7154–60, nov. 2002.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, SP: FEALQ, 2002. p. 920.

GANGLBERGER, E. *et al.* Monovalent fusion proteins of IgE mimotopes are safe for therapy of type I allergy. **FASEB J.**, v. 15, p. 2524–2526. 2001.

GARRAFA, V.; PESSIN, I. L. (Orgs.). **Bioética: poder e injustiça**. São Paulo: Loyola, 2004.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M.W. Field-evolved resistance to *Bt* maize by western corn rootworm. **PLoS ONE** 6, e22629, 2011.

GATEHOUSE, A. M. *et al.* Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. **J. Insect Physiol.**, v. 45, p. 545–5558. 1999.

GATEHOUSE, A. M. *et al.*, Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. B**, v. 12, n. 366(1569), p. 1438–52, may. 2011.

GILES, K. L. *et al.* Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize grain on *B. thuringiensis*-susceptible *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 93, n. 3, p. 1011–6, jun. 2000.

GILL, M. D. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. **Microbiol. Rev.**, v. 46, p. 86–94, 1982.

GILL, M.; ELLAR, D. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. **Insect Mol. Biol.**, v. 11, p. 619–625. 2002.

GOBATTO, V. *et al.* *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Braz. J. Biol.**, v. 70, n. 4, p. 1039–46, nov. 2010.

GOLDIM. **Princípio da Precaução**. 2002. Disponível em: <<http://www.bioetica.ufrgs.br/precau.htm>>. Acesso em: 26 nov. 2012.

GOODMAN, R. E. *et al.* Assessing genetically modified crops to minimize the risk of increased food allergy: a review. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 137, p. 153–166. 2005.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 43, p. 701–726. 1998.

GRISOLIA, C. K. *et al.* Genotoxic evaluation of different delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. **Mutat. Res.**, v. 31, n. 672, suppl. 2, p. 119-23, jan. 2009.

GROSSI-DE-AS, M. F. *et al.* **Molécula de ácido nucléico isolada, construção gênica, vetor, célula transgênica, método para obtenção de uma célula e de uma planta transgênica, polipeptídeo isolado e purificado, composição pesticida biodegradável, método para o controle de uma praga, método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga.** BR n. PI 012090001018, 2009.

GROSSI-DE-SA, M. F. *et al.* Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a cryIIa-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, n. 40, suppl. 5, p. 773-82, sep. 2007.

GRUNEWALD, W.; BURY, J. Comment on "Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize" by Séralini *et al.* **Food Chem. Toxicol.**, v. 53, p. 432-3, mar. 2013

GUERRERO, G. G. *et al.* Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins: role of the N-terminal region. **Mol. Immunol.**, v. 41, n. 12, p. 1177-83, nov. 2004.

GUIMARÃES, L. M. *et al.* Short-term evaluation in growing rats of diet containing *Bacillus thuringiensis* CryIIa12 entomotoxin: nutritional responses and some safety aspects. **J. Biomed. Biotechnol.** v. 2010. 2010.

HAMMOND, B. G.; KOCH, M. S. A Review of the Food Safety of *Bt* Crops. Chapter 16. *In*: SANSINENA, E. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis* Biotechnology**. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2012. p. 305-325.

HASHIMOTO, W. *et al.* Safety assessment of genetically engineered potatoes with designed soybean glycinin: compositional analyses of potato tubers and digestibility of the newly expressed protein in transgenic potatoes. **J. Sci. Food Agric.**, v. 79, p. 1607–1612. 1999.

HAYNES, J. W.; SMITH, J. W. Longevity of Laboratory-Reared Boll-Weevils (Coleoptera, Curculionidae) Offered Honey Bee-Collected Pollen and Plants Unrelated to Cotton. **J. Entomol. Sci.**, v. 27, n. 4, p. 366-374. 1992.

HE, K. L.; WANG, Z. Y.; ZHANG, Y. J. Monitoring *Bt* resistance in the field: China as a case study. *In*: FERRY, N.; GATEHOUSE, A. M. R. **Environmental impact of genetically modified crops**. Wallingford, UK: CAB International, 2009. p. 344–359.

HEAD, G. B. *et al.* Natural enemy abundance in commercial Bollgard® and conventional cotton fields. **Proc. Beltwide Cotton Conference**. Memphis, TN: National Cotton Council, v. 2, 2001. p. 796-798.

HEDRICH, H. (Org.). **The laboratory mouse**. 1ª ed. Academic Press, 2012. 868 p.

- HÉROUET, C. *et al.* Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 41, n. 2, p. 134-49, mar. 2005.
- HEROUET-GUICHENEY, C. *et al.* Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 54, n. 2, p. 143-53, jul. 2009.
- HILEMAN, R. E. *et al.* Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 128, p. 280-291. 2002.
- HISSA, D. C. *et al.* Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **J. Exp. Biol.**, v. 211, p. 2707-2711, 2008.
- HOFFMANN, M. P. *et al.* Field Evaluation of Transgenic Tobacco Containing Genes Encoding *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin or Cowpea Trypsin Inhibitor: Efficacy Against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Econ. Entomol.** v. 85, n. 6, p. 2516-2522(7), dec. 1992.
- HOPP, T. P.; WOODS, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 78, p. 3824-3828. 1981.
- HUANG, F.; ANDOW, D. A.; BUSCHMAN, L. L. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of *Bt* crop use in North America. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 140, p. 1-16. 2011.
- JAMES, C. **Global review of commercialized transgenic crops: 2001.** ISAAA Brief n. 26. Ithaca, New York: ISAAA, 2002.
- JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009.** ISAAA Brief n. 41. ISAAA: Ithaca, NY, 2009.
- JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011.** ISAAA Brief n. 43. Ithaca, NY: ISAAA, 2011.
- JANMAAT, A.F.; MYERS, J.H. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage looppers, *Trichoplusia ni*. **Proc. Roy. Soc. Lond. B**, v. 270, p. 2263-2270. 2003.
- JENKINS, N.; PAREKH, R. B.; JAMES, D. C. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. **Nat. Biotechnol.**, v. 14, p. 975-981. 1996.
- JUBERG, D. R. *et al.* Acute and repeated dose (28 day) mouse oral toxicology studies with Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Bt proteins used in coleopteran resistant DAS-59122-7 corn. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 54, n. 2, p. 154-163. 2009.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS (ISAAA). **GM database approval**. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/default.asp>>. Acesso em: 05 nov. 2012.

ISHIKAWA, H. *et al.* A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Biotechnol.**, v. 36, p. 90-101. 2007.

IVES, A. R. *et al.* The evolution of resistance to two-toxin pyramid transgenic crops. **Ecol. Appl.**, v. 21, n. 2, p. 503-15, mar. 2011.

KATIKA, M. R. *et al.* Exposure of Jurkat cells to bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) induces transcriptomics changes indicative for ER- and oxidative stress, T cell activation and apoptosis. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 254, n. 3, p. 311-22, aug. 2011

KATIKA, M. R. *et al.* Transcriptome analysis of the human T lymphocyte cell line Jurkat and human peripheral blood mononuclear cells exposed to deoxynivalenol (DON): New mechanistic insights. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 264, n. 1, p. 51-64, oct. 2012.

KIM, H. S. *et al.* *In vitro* cytotoxicity of non-cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. **J. Appl. Microbiol.**, v. 89, n. 1, p. 16-23, jul. 2000.

KLETER, G. A.; PEIJNENBURG, A. A. Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE - binding linear epitopes of allergens. **BMC Struct. Biol.**, v. 12, n. 2, p. 8, dec. 2002.

KNAAK, N.; FRANZ, A.R.; SANTOS, G.F.; FIUZA, L.M. Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae). **Braz. J. Biol.**, v. 70, n. 3, p. 677-84, aug 2010.

KONIG, A. *et al.* Assessment of the Safety of Foods Derived from Genetically Modified (GM) Crops. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 1047-1088. 2004.

KOZIEL, M. G. *et al.* Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Nat. Biotechnol.**, v. 11, n. 2 p. 194-200. 1993.

KUMAR, S.; CHANDRA, A.; PANDEY, K. C. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. **J. Environ. Biol.**, v. 29, n. 5, p. 641-53, sep. 2008.

LADICS, G. S. Current codex guidelines for assessment of potential protein allergenicity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, suppl. 10, p. S20-3, oct. 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 689-695. 1970.

LAMB, J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p. 54-60. 2007

LAMB, J. *et al.* The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. **Science**, v. 313, p. 1929–1935. 2006.

LEROUGE, P. *et al.* N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. **Plant Mol. Biol.**, v. 38, p. 31–48. 1998.

LIENER, I.E. Antinutritional factors related to proteins and amino acids. *In*: HUI, Y.H.; GORHAM, J.R.; MURELL, K.D.; CLIVER, D.O. (Eds.). **Foodborne Disease Handbook. Disease Caused by Hazardous Substances**. New York, NY: Marcell Dekker, 1994. p. 261–309.

LIMA, P. D. L. *et al.* Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, n. 7, p. 1154-1159. 2007.

LIMA, P.D. *et al.* Genotoxic and cytotoxic effects of iron sulfate in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 3, p. 723-9, apr. 2008.

LIMA, P.D. *et al.* Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Toxicol In Vitro**. 2008b 22(4):1032-7, jun. 2008.

LIN, K. *et al.* MADMAX - Management and analysis database for multiple ~omics experiments. **J. Integr. Bioinform.**, v. 8, n. 2, p. 160, jul. 2011.

LIU, C. *et al.* Cotton bollworm resistance to *Bt* transgenic cotton: a case analysis. **Sci. China Life Sci.**, 53(8):934-41., aug. 2010.

LIU, P. *et al.* A 90-day subchronic feeding study of genetically modified maize expressing Cry1Ac-M protein in Sprague-Dawley rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 50, n. 9, p. 3215-21, sep. 2012.

LUTTRELL, R. G. *et al.* Cotton pest management: Part 1. A worldwide perspective. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 39, p. 517–526. 1994.

MAGALHÃES, M. D. M. *et al.* The mouse as an experimental model for *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **Acta Cir. Bras.**, v. 13, p. 260–263. 1998.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Proteins. *In*: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. (Eds.). **Krause's food, Nutrition and diet Therapy**. 9 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998. Cap.5, p. 63-76.

MANDIMIKA, T. *et al.* Differential gene expression in intestinal epithelial cells induced by single and mixtures of potato glycoalkaloids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 24, p. 10055–10066. 2007a.

- MANDIMIKA, T. *et al.* Induction of the cholesterol biosynthesis pathway in differentiated Caco-2 cells by the potato glycoalkaloid chaconine. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, n. 10, p. 1918–1927. 2007b.
- MANDIMIKA, T. *et al.* PI3K/AKT, JNK, and ERK pathways are not crucial for the induction of cholesterol biosynthesis gene transcription in intestinal epithelial cells following treatment with the potato glycoalkaloid alpha-chaconine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, n. 56, suppl. 18, p. 8745-52. 2008.
- MARCHANT, G. E. Toxicogenomics and toxic torts. *Trends Biotechnol.* v. 20, n. 8, p. 329-32, aug. 2002.
- MARQUEZ, A. M; DIAS, J. M.; RIBEIRO, B. M. Screening and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Brazil for the presence of coleoptera-specific cry genes. **Microbiol. Res.**, v. 154, n. 4, p. 355-62, mar. 2000.
- MARTINS, E. S. *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biol. Control**, v.40, n. 1, p. 65-68, jan. 2007.
- MARTINS, E. S. *et al.* Recombinant CryIa protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, n. 5, p. 1363-71, may. 2008.
- MAYERS, P. R. *et al.* The concept of substantial equivalence: An overview. Chapter 3. In: ATHERTON, K. T. (Ed.). **Genetically modified crops: assessing safety**. London, UK: Taylor & Francis, 2002. 256p.
- MCBRIDE, K. E. *et al.* Amplification of a chimeric bacillus gene in chloroplasts LEads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. **Biotechnology (NY)**, v. 13, n. 4, p. 362-5. apr. 1995.
- MCHUGHEN, A. Introduction to the GM crops special issue on biosafety, food and GM regulation. **GM Crops Food**. v. 3, n. 1, p. 6-8, jan-mar. 2012.
- MENDELSON, M. *et al.* Are *Bt* crops safe? **Nat. Biotechnol.** v. 21, p. 1003–1009. 2003.
- MENDELSON, J.; BASELGA, J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 2787-2799. 2003.
- MERKER, M. P.; LEVINE, L. A protein from the marine mollusc *Aplysia californica* that is hemolytic and simulates arachidonic acid metabolism in cultured mammalian cells. **Toxicon**, v. 24, n. 5, p. 451-465. 1986.
- MESNAGE, R. *et al.* Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac *Bt* insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. **J. Appl. Toxicol.**, “in press”. 2012.
- METCALFE, D. D. Genetically modified crops and allergenicity. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 9, p. 857-60. sep. 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **Indicadores da Agropecuária**. Ano X, No. 4, 2001.

MILITÃO, G. C. *et al.* In vitro and in vivo anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. **Pharm. Biol.**, v. 50, n. 12, p. 1479-87, dec. 2012.

MIRANDA, J. E. **Manejo de pragas do algodoeiro no Cerrado Brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 22p.

MISHRA A. *et al.* In silico assessment of the potential allergenicity of transgenes used for the development of GM food crops. **Food Chem. Toxicol.**, v. 50, n. 5, p. 1334-9, may. 2012.

MOHAMED, Z. A. First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 59, p. 749-761. 2007.

MONNERAT, R. G. *et al.* Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biol. Control**, v. 41, n. 3, p. 291-295, jun. 2007.

MORAIS, J. K. S. **Potencial biotecnológico da toxina da soja (sbtx) como uma ferramenta contra fungos**. 2010. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MORENO-FIERROS, L. *et al.* Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. **Microbes Infect.**, v. 2, n.8, p. 885-90, jul. 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 16, n. 65(1-2), p. 55-63, dec. 1983.

MUNKVOLD, G. P.; HELLMICH, R. L.; RICE, L. G. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic *Bt* maize hybrids and nontransgenic hybrids. **Plant Dis.**, v. 83, p. 130-138. 1999.

MURPHY, A. E.; PERELLA, J. Woodrow Wilson Foundation Biology Institute. "**A Further Look at Biotechnology**." Princeton, NJ: The Woodrow Wilson National Fellowship Foundation, 1993.

NAKASU, E. Y. T. *et al.* Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 104, n. 3, p. 227-230. 2010.

NOTEBORN, H. *et al.* Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein CRYIA(b) expressed in tomato. In: TAKEOKO, G.R.; TERANISHI, R.; ENGEL, K.H. (Eds.). **Genetically Modified Foods: Safety Issues**. Washington, DC: American Chemical Society, 1996. p. 23-26.

NUWAYSIR, E. F. *et al.* Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. **Mol. Carcinog.** v. 24, n. 3, p. 153-9, mar. 1999.

OBATA, T.; BROWN, G. E.; YAFFE, M. B. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. **Crit. Care Med.**, v. 28, n. 4, p. N67-77, apr. 2000.

OBRYCKI, J. J. *et al.* Transgenic insecticidal corn: beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. **BioScience**, v. 51, p. 353-361. 2001.

OLIVEIRA G.R. *et al.* Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **BMC Biotechnol.**, v. 9, n. 11, p. 85, sep. 2011.

OLIVEIRA, G. R. **Novas Moléculas Cry ativas contra *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda***. 2008. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

OLLIVIER, L. A. Comment on "Séralini, G.-E., et al., Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food Chem. Toxicol.* (2012)," <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.005>. **Food Chem. Toxicol.**, v. 53, p. 443, mar. 2013.

ONOSE, J. *et al.* Evaluation of subchronic toxicity of dietary administered Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* var. Kurustaki HD-1 in F344 male rats with chemically induced gastrointestinal impairment. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 6, p. 2184-9, jun. 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins ENV/JM/MONO, Organization for Economic Co-Operation and Development. 2007. Disponível em: <http://www.epa.gov/opp00001/biopesticides/pips/reg-biotech.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Food safety evaluation. Paris, Organization for Economic Co-operation and Development, 1996.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg425.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2012.

PARDO-LÓPEZ, L. *et al.* Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, v. 30, p. 589-595. 2009.

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 88, n. 1, p. 91-142, may. 2005.

PEARSON, W. R.; LIPMAN, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 8, p. 2444-8, apr. 1988.

PEDERSEN, J. **Application of substantial equivalence data collection and analysis**. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Topic 2, 2000. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/Bio-04.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2012.

- PENG, D. *et al.* Safety assessment of transgenic *Bacillus thuringiensis* with VIP insecticidal protein gene by feeding studies. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, p. 1179–1185, 2007.
- PERLAK, F. J. *et al.* Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Mol. Biol.**, v. 22, n. 2, p. 313-21, may. 1993.
- PODIMATA, M.; KOUTSERIS, E.; TSIROPOULOS, N. Water quality assessment by ecotoxicological and chemical methods in Magnesia, Greece. **Water Air Soil Pollut: Focus**, v. 4, p. 179–187. 2004.
- POPOFF, M. R. Interactions between bacterial toxins and intestinal cells. **Toxiconomy**, v. 36, p. 665–685. 1998.
- PORTUGAL, A. D.; SAMPAIO, M. J.; CONTINI, E.; ÁVILA, F. Agricultural biotechnology in Brasil – Institutional and implications of genetically modified organisms. *In: 5th International Conference of the International Consortium on Agricultural Biotechnology Research (ICABR)*, Ravello: ICABR, 2001.
- POSSO, M. B. S.; SANT'ANNA, A. L. G. G.; GIARETTA, V. M. A.; CHAGAS, L. R.; CARDOSO, P. G. R. Biossegurança: o viver de sua interdisciplinaridade. **Prática Hospitalar**, v. 7, p.154-157, 2004.
- PRIETO-SAMSONOV, D. L. *et al.* *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology, *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.*, v. 19, p. 202–219. 1997.
- PRIHODA, K. R.; COATS, J. R. Aquatic fate and effects of *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein: toward risk assessment. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 27, n. 4, p. 793-8, apr. 2008.
- PRIHODA, K. R.; COATS, J. R. Fate of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Cry3Bb1 protein in a soil microcosm. **Chemosphere**, v. 73, n. 7, p. 1102-7, oct. 2008.
- PRIVALLE, L. *et al.* Heat stability, its measurement, and its lack of utility in the assessment of the potential allergenicity of novel proteins. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 61, n. 3, p. 292-5, dec. 2011.
- PUTHALAKATH, H. *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1337-49, jun. 2007.
- RAMALHO, F. S. Utilização do controle biológico como estratégia para o MIP algodão. *In: ANAIS CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO*. Goiânia, 2003.
- RANDHAWA, G. J.; SINGH, M.; GROVER, M. Bioinformatic analysis for allergenicity assessment of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins expressed in insect-resistant food crops. **Food Chem Toxicol.** 2011 Feb;49(2):356-62, feb. 2011.
- RATNER, B.; UNTRACHT, S.; COLLINS-WILLIAMS, C. Allergenicity of modified and processed foodstuffs. 1. The use of a dual ingestion passive transfer test to determine the allergenicity of foodstuffs in man. **Ann. Allergy**, v. 10, p. 675–681. 1952.

RAYBOULD, A.; QUEMADA, H. *Bt* crops and food security and in developing countries: realized benefits, sustainable use and lowering barriers to adoption. **Food Security**, v. 2, p. 247-259. 2010.

REVINA, L.P. *et al.* Novel antibacterial proteins from entomocidal crystals of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. **Can. J. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 141-8, feb. 2005.

RIBEIRO, S. F. F. *et al.* A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: partial characterization and antifungal activity. **Sci. Hort.**, v. 111, p. 399-405. 2007.

ROESLER, K. R.; RAO, A. G. Rapid gastric fluid digestion and biochemical characterization of engineered proteins enriched in essential amino acids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 7, p. 3443-51, jul. 2001.

ROGÉRIO, M.C.P. *et al.* Uso do caroço de algodão na alimentação de ruminantes. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, v. 6, n. 1, p. 85-90. 2003.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nat. Biotechnol.**, v. 24, n. 1, p. 63-71, jan. 2006.

ROSIC, N. N. *et al.* Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by DNA family shuffling. **Gene**, v. 395, n. 1-2, p. 40-48. 2007.

SAKAGUCHI, G.; OHISHI, T.; KOZAKI, S. Botulism – structure and chemistry of botulinum toxins. In: HERDEGREE, M.C.; TU, A.T. (Eds.). **Handbook of Natural Toxins**. New York, NY: Marcel Dekker, 1988. p. 191–216.

SANAHUJA, G. *et al.* *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotech. J.**, v. 9, p. 283–300. 2011.

SANCHEZ-FORTUN, S. *et al.* Acute sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to seven chlorinated solvents. **Bull. Environ. Contam. Tox.**, v. 59, p. 445–451. 1997.

SANDERS, P. R. *et al.* Safety assessment of insect-protected corn. In: Thomas, J.A. (Ed.). **Biotechnology and Safety Assessment**. 2nd ed. Taylor and Francis, 1998. p 241-256.

SANTOS, R. C. *et al.* Mechanical damage in cotton buds caused by the boll weevil. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 38, p. 1351–1355. 2003.

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. **Algodão: Tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. p. 181-226.

SCHORSCH, F. Serious inadequacies regarding the pathology data presented in the paper by Seralini *et al.* **Food Chem. Toxicol.**, v. 53, p. 450-1, mar. 2013.

SÉRALINI, G. E. *et al.* Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Food Chem. Toxicol.**, v. 50, n. 11, p. 4221-31, nov. 2012.

SÉRALINI, G. E.; CELLIER, D.; VENDOMOIS, J.S. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 52, n. 4, p. 596-602, may. 2007.

SGARBIERI, V. C. Fontes de proteínas na alimentação. In: _____. Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações. São Paulo: Varela, 1996. p.139-257.

SHIMADA, N. et al. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 65(2):187-91, feb. 2003.

SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. Warfare, weaponry, and the casualty. In: SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. (Eds.). *Textbook of Military Medicine. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Vol. 3. Washington, DC: Borden Institute, Walter Reed Medical Center, 1997.

SIEGEL, J. P.; SHADDUCK, J. A. Safety of microbial insecticides to vertebrates. In: LAIRD, M.; LACEY, L.; DAVIDSON, E. (Eds.). *Safety of microbial insecticides*. Boca Raton: CRC Press, 1989.

SILVA, C. D. A. Efeito da formulação e aplicação de *Beauveria bassiana* no controle do bicudo do algodoeiro. **Rev. Bras. Oleag. Fibr.**, v. 5, p. 433-437. 2001.

SILVA-WERNECK, J. O.; ELLAR, D. J. Characterization of a novel Cry9Bb delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 98, n. 3, p. 320-8, jul. 2008.

SILVIE, P.; LEROY, T. Manual de Identificação das Pragas e Seus Danos no Algodoeiro. Cascavel: COODETEC, 2001. 100p.

SMOLIN, L. A.; GROSVENOR, M. B. *Nutrition Science & Applications*. 3^a ed. New York, NY: Saunders College Publishing, 2000.

SOBERON, M. *et al.* Mode of Action of Mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 597-600. 2007.

SONG, X. X.; WANG, S. M. Status and evaluation on the expression of cotton varieties in the production in China in the past 20 years. **Cotton Sci.**, v. 13, p. 315–320. 2000.

SOUZA, T. M. *et al.* Toxicity of Brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and nontarget animals. **J. Med. Entomol.**, v. 48, n. 4, p. 846-51, jul. 2011.

STOOP, A. A. *et al.* High-density mutagenesis by combined DNA shuffling and phage display to assign essential amino acid residues in protein-protein interactions: application to study structure-function of plasminogen activation inhibitor 1 (PAI-I). **J. Mol. Biol.**, v. 301, p. 1135-1147. 2000.

STORER, N. P. *et al.* Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **J. Econ. Entomol.**, v. 103, p. 1031–1038. 2010.

SUBRAMANIAN, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 43, p. 15545-50, oct. 2005.

TABASHNIK, B. E. *et al.* Efficacy of genetically modified *Bt* toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. **Nat. Biotechnol.**, v. 29, n. 12, 1128-31. 2011

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 39, p. 47–79. 1994.

TABASHNIK, B. E. *et al.* Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. **Nat. Biotechnol.**, v. 26, p. 199–202. 2008.

TABASHNIK, B. E.; DENNEHY, T. J.; CARRIERE, Y. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 15389–15393. 2005.

TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data. **J. Econ. Entomol.**, v. 102, p. 2011–2025. 2009.

TABASHNIK, B. E.; WU, K.; WU, Y. Early detection of field-evolved resistance to *Bt* cotton in China: Cotton bollworm and pink bollworm. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 110, n. 3, p. 301–306, jul. 2012.

TEIXEIRA CORRÊA, R. F. *et al.* Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis δ -endotoxins towards insect and mammalian cells. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46121. 2012.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.

THE FOOD TIMELINE. Disponível em: <<http://www.foodtimeline.org>>. Acesso em: 10 out. 2012.

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: <<http://ftp.fao.org/es/esn/food/Bio-03.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2012.

U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Biopesticide Resgistration Action Document. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protein and the Genetic Material (Vector PV-GMIR9) Necessary for Its Production in MON 87701 (OECD Unique Identifier: MON 877Ø1-2) Soybean [PC Code 006532]. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs Biopesticides and Pollution Prevention Division. 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/bt-cry1ac-protien.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

- USP. 1995. Simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. TS. In: **The United States Pharmacopeias 23, The National Formulary 18**. Rockville, MD: The United States Pharmacopeia Convention, Inc., 1995. p. 2053.
- VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J.L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 111, n. 1, p. 1-12, sep. 2012.
- VAECK, M. *et al.* Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, p. 33-37, 1987.
- VAN DE WAL, Y. *et al.* Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, n. 10, p. 3133-9. oct. 1999.
- VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 101, p. 1-16. 2009.
- VAN HAL, N. L. W. *et al.* The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **J. Biotechnol.**, v. 78, p. 271-280. 2000.
- VAN RENSBURG, J. B. J. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to *Bt*-transgenic maize. **S. Afr. J. Plant Soil**, v. 24, p. 147-151. 2007.
- VAN KOL, S. W. *et al.* Transcriptomics analysis of primary mouse thymocytes exposed to bis(tri-n-butyltin)dioxide (TBTO). **Toxicology**. v. 14, n. 296, suppl. 1-3, p. 37-47. jun. 2012.
- VASCONCELOS, I. M. *et al.* SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean (*Glycine max*) proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon**, v. 51, n. 6, p. 952-63, may. 2008
- VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I. *et al.* Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by *CryIAc* protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 147-55, feb. 2000a.
- VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I. *et al.* *CryIAc* protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 29, n. 271, suppl. 1, p. 54-8, apr. 2000b.
- VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I. *et al.* Intragastric and intraperitoneal administration of *CryIAc* protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. **Life Sci.**, v. 64, n. 21, p. 1897-912. 1999.
- VERMA, A. S. *et al.* Biotechnology in the realm of history. **J. Pharm. Bioall. Sci.**, v. 3, p. 321-3. 2011.
- WAN, P. *et al.* Increased frequency of pink bollworm resistance to *Bt* toxin *CryIAc* in China. **PLoS ONE**, v. 7, p. e29975. 2012.
- WATANABE, E.; NUTTI, M. R. Alimentos geneticamente modificados: avaliação de segurança e melhorias de qualidade em desenvolvimento. **Rev. Bras. Milho Sorgo**, v. 1, n. 1, p. 1-14. 2002.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). **Application of the principles of substantial equivalence to safety evaluation of food and food components from plants derived by modern biotechnology.** Report of a WHO Workshop. Geneva: World Health Organization, Food Safety Unit, 1995.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). **Foods derived from modern technology: 20 questions on genetically modified foods.** 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/fsf/GMfood/2002>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). **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. 29p. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_june2000_en.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2012.

WOLFENBARGER, D. A.; HAMED, A. A.; LUTTRELL, R. G. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* and ca-thuringiensin against the boll weevil *Anthonomus grandis* (Boh.) [Coleoptera: Curculionidae]. In: **Beltwide Cotton Conference**, 1997.

WRIGHT, J. E.; CHANDLER, L. D. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against the boll weevil (Curculionidae: Coleoptera). **J. Invertebr. Pathol.**, v. 58, n. 3, p. 448-449. 1991.

WRIGHT, S. **Molecular politics: developing American and british regulatory policy for genetic engineering, 1972-1982.** Chicago: University of Chicago, Press, 1994.

WU, F. Mycotoxin reduction in *Bt* corn: Potential economic, health and regulatory impacts. **Transgenic Res.**, v. 15, p. 277-289. 2006.

XU, W. *et al.* Safety assessment of Cry1Ab/Ac fusion protein. **Food Chem. Toxicol**, v. 47, n. 7, p. 1459-65. 2009.

XU, X.; YU, L.; WU, Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. **Appl Environ Microbiol**, 71 p. 948-954, 2005.

YU, H. L.; LI, Y. H.; WU, K. M. Risk assessment and ecological effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* crops on non-target organisms. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 53, n. 7, p. 520-38, jul. 2011.

YUAN, L. *et al.* Laboratory-directed protein evolution. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 69, n. 3, p. 373-392. 2005.

YUDINA, T. G. *et al.* Antibacterial activity of Cry- and Cyt-proteins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. **Can. J. Microbiol.** v. 49, n. 1, p. 37-44, jan. 2003.

YUDINA, T. G. *et al.* Antimicrobial activity of different proteins and their fragments from *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals against clostridia and archaea. **Anaerobe**, v. 13, n. 1, p. 6-13, feb. 2007.

ZHANG, H. *et al.* Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of *Bt* cotton in China. **PLoS ONE**, v. 6, p. e22874. 2011.

ZHANG, Q. *et al.* Use of an Enhanced Green Fluorescence Protein Linked to a Single Chain Fragment Variable Antibody to Localize *Bursaphelenchus xylophilus* cellulose. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 71, n. 6, p. 1514-1520. 2007.

ZHAO, H.; ARNOLD, F. H. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 7997-8000. 1997.

ZHOU, H. *et al.* The antitumor activity of the fungicide ciclopirox. **Int. J. Cancer.**, v. 127, n. 10, p. 2467-77, nov. 2010