

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

Diana Karina Diaz Cánova

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA Cry1Ab DO MILHO
GENETICAMENTE MODIFICADO MON810 E DETECÇÃO
DAS POSSÍVEIS INTERAÇÕES COM PROTEÍNAS
ENDÓGENAS DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cánova, Diana Karina Diaz

Caracterização da proteína Cry1Ab do milho geneticamente modificado MON810 e detecção das possíveis interações com proteínas endógenas de milho / Diana Karina Diaz Cánova ; orientador, Rubens Onofre Nodari - Florianópolis, SC, 2014. 184 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Plantas geneticamente modificados. 3. Interações proteína-proteína. 4. Proteômica. I. Onofre Nodari, Rubens . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Diana Karina Diaz Cánova

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA Cry1Ab DO MILHO
GENETICAMENTE MODIFICADO MON810 E DETECÇÃO
DAS POSSÍVEIS INTERAÇÕES COM PROTEÍNAS
ENDÓGENAS DE MILHO**

Este (a) Dissertação/Tese foi julgado(a) adequado(a) para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 15 de Dezembro de 2014.

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Rosete Pescador, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Miguel Pedro Guerra, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado ao meu
amado pai Carlos Antonio Diaz
Mendoza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força durante esses anos de mestrado para eu fechar um ciclo importante da minha vida.

Ao meu amado pai Carlos A. Diaz Mendoza por dar-me seu amor incondicional e estar sempre presente nos momentos que mais precisei dele, dando-me seu apoio e incentivando-me a não desistir e a continuar.

A minha querida família e em especial a Susan Diaz de León e Raul León, por terem acreditado em mim e terem me incentivado a começar esta aventura “brashica”, sem vocês eu não estaria agora escrevendo estas palavras.

Ao meu orientador Rubens Onofre Nodari por ter me aberto as portas, dado a oportunidade de iniciar uma das etapas mais importantes de minha formação profissional.

A Terje Traavik, Malacky Okeke, Arinze Okoli e Thomas Bøhn do Centro de Biosegurança - GenØk pela grande ajuda que me ofereceram durante este ano, mesmo sendo pessoas muito ocupadas sempre dedicaram um pouco do seu tempo para minha pesquisa, se não fosse por eles eu não conseguiria ter concluído esse ciclo. Muito obrigada!

A professora Ana Carolina Arisi do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da UFSC e ao professor Daniel Mansur do Laboratório de Imunobiologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC por terem me facilitado o uso do espaço dos seus laboratórios para eu poder realizar meus experimentos e trabalhar tranquilamente.

A Gabriela Cangahuala pela paciência, bom humor e confiança. Obrigada Gaby por ter me ajudado e ensinado tanto durante todo esse tempo, você foi uma peça fundamental durante meu mestrado. Só posso dizer que você é simplesmente uma pessoa maravilhosa!

A minhas irmãs do peito, Daniela de Conti (Pedrita) e Pâmela Martins Vieira (Gata), por fazerem meus dias no Brasil mais leves e de Floripa é um lugar mais aconchegante. Amo vocês!

Ao Carlos G. Quiroz por sua paciência, bom humor, seus conselhos, palavras de ânimo, a ajuda no lab, etc, etc... não terminaria de enumerar as coisas que você fez e quanto me ajudou, muito obrigada “frentón”!

Ao Juan P. Quimbayo pela paciência, as boas energias e as palavras de ânimo que sempre me proporcionou nos momentos mais difíceis durante este ano.

E aos meus queridíssimos, lindos e preciosos amigos de laboratório Juan Manuel Otalora, Lido Borsuk, Liliana Pila, Fernando Sanchez (Fernandito), Luciano Saifert (Lucianito) e Jenny Paola Corredor por fazerem dos meus dias do lab muito divertidos e felizes.

A Carina Macagnan R., Daniel F. Holderbaum, e especialmente a Sarah Agapito por ter me ajudado tanto no início do mestrado e por toda a paciência que teve.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de ingressar no curso e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado durante esses dois anos.

Agradeço ao Centro de Biosegurança – GenØk não somente pelo apoio financeiro, mas também pelas recomendações e sugestões durante o desenvolvimento do projeto.

RESUMO

O milho MON810 tem inserido em seu genoma o gene truncado *cry1Ab* oriundo da bactéria *B. thuringiensis* (*Bt*). O gene *cry1Ab* produz a proteína inseticida Cry1Ab que confere à planta resistência aos insetos da ordem Lepidoptera. Mas a inserção do gene *cry1Ab* no milho MON810 foi incompleta, dado que parte da região 3' da construção original não foi integrada no genoma do milho, incluindo o terminador NOS. Neste contexto, o principal objetivo foi detectar as possíveis interações da proteína Cry1Ab com as proteínas endógenas de milho. Neste estudo foram utilizadas folhas de milho MON810 no estágio V2 para a caracterização da proteína Cry1Ab e a detecção de possíveis proteínas ligadas à Cry1Ab. Na caracterização da Cry1Ab, foi quantificada a proteína Cry1Ab no limbo e na bainha das folhas por DAS-ELISA, mostrando que o conteúdo da proteína Cry1Ab no limbo ($55,56 \pm 6,54 \mu\text{g}$ Cry1Ab/g massa fresca) foi seis vezes maior do que na bainha ($10,29 \pm 2,42 \mu\text{g}$ /g massa fresca). Para a extração da proteína Cry1Ab os protocolos de Mekawi e Gruber resultaram em maior rendimento de extração da proteína Cry1Ab. Os extratos protéicos de milho MON810 foram analisados por Western Blot. O ensaio evidenciou quatro bandas imunorreativas de 70 kDa, 65 kDa, 39 kDa e 34 kDa correspondentes à proteína Cry1Ab, embora em alguns dos extratos foram detectadas bandas imunorreativas maiores do que 120 kDa em vez da proteína Cry1Ab ativa (70 kDa e 65 kDa). No ensaio de imunoprecipitação foram identificadas 49 proteínas de milho coimunoprecipitadas com a proteína Cry1Ab. De forma similar, o ensaio de Ligand blot mostrou que a proteína Cry1Ab poderia estar ligada com proteínas do milho, especialmente uma de 18 kDa, presente tanto nas plantas transgênicas ou na isolinha. Em conclusão, este estudo encontrou (i) evidência da interação entre a proteína Cry1Ab e proteínas do milho; (ii) variação na quantidade de proteína Cry1Ab em distintas partes da folha e (iii) quatro formas moleculares distintas (70 kDa, 65 kDa, 39 kDa e 34 kDa) da proteína Cry1Ab, ao invés de uma como indicado pela empresa proponente da tecnologia.

Palavras chaves: proteína truncada, OGM, ligand blot, imunoprecipitação, oligômeros, MON810.

ABSTRACT

The MON810 maize has a truncated version of the *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* inserted into its genome. The *cryIAb* gene produces the insecticidal protein Cry1Ab that confers on the maize resistance to insects of the order Lepidoptera. The construct used in the genetic transformation of MON810 maize contained the *CaMV 35S* promoter, the *hsp70* intron, the *cryIAb* gene and the NOS terminator. However, a truncation at the 3' end of the *cryIAb* gene led to the complete loss of the NOS terminator, and insertion of *cryIAb* gene was incomplete. In this context, the aim of this work was to detect possible interactions of Cry1Ab protein with endogenous protein maize. This study used MON810 leaves (stage V2) to characterize the Cry1Ab protein and to detect possible interaction of Cry1Ab with endogenous maize proteins. To characterize the Cry protein, it was quantified in lamella and sheath by DAS-ELISA. Cry1Ab protein concentration in lamella ($55.56 \pm 6.54 \mu\text{g Cry1Ab} / \text{g fresh weight}$) was six times greater than the sheath ($10.29 \pm 2.42 \mu\text{g} / \text{g fresh weight}$). For the extraction of the Cry1Ab protein, five extraction protocols were compared. The protocols of Mekawi and Gruber gave the highest extraction yields of the Cry1Ab protein. The protein extracts of transgenic maize were analyzed by Western blot. The analysis revealed four immunoreactive bands immunoreactive (70 kDa, 65 kDa, 39 kDa and 34 kDa) corresponding to the Cry1Ab protein, although in some extracts, immunoreactive bands greater than 120 kDa were detected instead of the active Cry1Ab protein (70 kDa and 65 kDa). In addition, in the immunoprecipitation assay there were 49 co-immunoprecipitated proteins from maize with the Cry1Ab protein. Similarly, Ligand blot assay showed that the Cry1Ab protein could be binding with maize proteins, especially an 18 kDa protein which was present in both transgenic and isogenic maize. In conclusion, it was found (i) evidence of interaction between Cry1Ab protein and corn proteins; (ii) variation in the amount of Cry1Ab in distinct part of the leaves, and (iii) four distinct molecular form (70 kDa, 65 kDa, 39 kDa e 34 kDa), instead one indicated by the proponent of the technology.

Keywords: Cry1Ab, truncated protein, GMO, ligand blot, immunoprecipitation, oligomers, MON810.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da ativação da protoxina Cry1. Região pontilhada: representa a região removida pelas proteases (Fonte: RUKMINI et al., 2000).32
- Figura 2.** Esquema do mecanismo de ação das proteínas Cry em Lepidopteras. (1) Solubilização e ativação da toxina. (2) Ligação da toxina monomérica Cry as proteínas ALP e APN. (3) A toxina monomérica Cry se liga ao receptor CAD e induz a clivagem da hélice $\alpha 1$. (4) Oligomerização da Cry. (5) O oligômero de Cry se liga às proteínas ALP e APN. (6) Inserção do pré-poro na membrana causando a formação do poro. (Fonte: PARDO-LÓPEZ et al., 2013).....33
- Figura 3.** O modelo proposto para a ação da toxina Cry por Zhang et al. (2006). A toxina Cry se liga à proteína do tipo caderina (CAD) e estimula a proteína G e adenilato ciclase (AC), que promove a produção de intracelular adenilato monofosfato ciclase (AMPc). Por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA) que desestabiliza os canais do citoesqueleto e íons, levando à morte celular. RLT: região de ligação da toxina Cry; GDP: guanosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato.34
- Figura 4.** Representação esquemática da estrutura da toxina Cry1A. O domínio I, II e III estão mostrados em vermelho, verde e azul, respectivamente. (Fonte: PIGGOT et al., 2007).36
- Figura 5.** (A) Representação esquemática do cassete usado na transformação do evento MON810. (B) Representação esquemática do inserto no evento MON810. P35S: promotor 35S CaMV do vírus do mosaico da couve-flor, hsp70 : Íntron de proteína de choque térmico hsp70 de milho, cry1Ab: gene da proteína Cry1Ab de *B. thuringiensis*, NOS: terminador de nopalina sintase.....37
- Figura 6.** Representação esquemática das diferentes formas de ativação da proteína Cry1Ab em preparações Bt bacterianas (à esquerda) e os cultivos Bt (à direita). (Fonte: SZÉKÁCS & DARVAS, 2012).....38
- Figura 7.** Plantas de milho MON810 e milho isogênico de 12 dias após semeadura, crescidas em Estufa Incubadora Microprocessada para BOD (A) e em um quarto de crescimento (B).50
- Figura 8.** Esquema da metodologia usada para conferir a presença dos transgenes (P35S e cry1Ab) e do gene da zeína.....51

Figura 9. Posição das partes da folha do milho V2 amostradas para a análise de DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay).....	58
Figura 10. Esquema resumido da metodologia seguida na quantificação de Cry1Ab e estimação da massa molecular da proteína Cry1Ab por Western Blot.....	59
Figura 11. Esquema resumido da metodologia seguida antes e após o ensaio de imunoprecipitação	66
Figura 12. Esquema resumido da metodologia seguida antes, durante e após o ensaio de Ligand Blot.	71
Figura 13. Fragmentos amplificados do gene da zeína (329pb), promotor 35S (123 pb) e gene cry1Ab (~1000pb). Linha 1: Marcador molecular de 1000 pb. Linha 2: Água. Linha 3: Controle negativo, DNA de milho isogênico. Linha 4: Controle positivo, DNA de milho MON810 . Linhas 5-7: DNA dos três pools gênicos do milho isogênico. Linhas 8-10: DNA dos três pools gênicos do milho MON810. Linha 11: Marcador molecular de 10000 pb. Linha 12: Água. Linha 13: Controle negativo, DNA de milho isogênico. Linha 14: Controle positivo, DNA de milho MON810. Linhas 15-17: DNA dos três pools gênicos do milho isogênico. Linhas 18-20: DNA dos três pools gênicos do milho MON810.	73
Figura 14. Conteúdo médio da proteína Cry1Ab no limbo e na bainha de milho MON810 no estágio de desenvolvimento V2. SD: desvio padrão. n: número de plantas. CV(%): porcentaje de coeficiente de variação.	75
Figura 15. Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab (70 kDa, 65 kDa, 39 kDa e 34 kDa) nos extratos protéicos de milho MON810 obtidos com diferentes protocolos de extração. M: Marcador de massa molecular (kDa). Linha 1: Extrato de milho isogênico, controle negativo. Linha 2: Proteína purificada Cry1b ativa, controle positivo. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7: Extratos protéicos obtidos usando o protocolo de Gruber, Mekawi, Pobozy, Rocca pH7,4 e Rocca pH 10,6, respectivamente. As setas vermelhas indicam as quatro bandas imunorreativas correspondentes à proteína Cry1Ab. O cuadro verde indica as bandas imunoreativas maiores a 70kDa.	76

Figura 16. Western Blot 2D da proteína Cry1Ab na amostra protéica de milho MON810 (A), de milho isogênico (D) e da proteína purificada Cry1Ab ativa (C). Gel bidimensional de amostra protéica de milho MON810 corado com azul de coomassie (B). As amostras foram extraídas segundo o protocolo de Gruber et al. (2001).78

Figura 17. Rendimento médio de extração de proteínas totais (mg.g-1 massa fresca) de folhas de milho MON810 de cinco protocolos de extração. As diferentes letras nas barras indicam que existe diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=3$).80

Figura 18. Western Blot mostrando as proteína Cry1Ab de 70 kDa, 65 Kda, 39 Kda e 34 kDa, nos extratos protéicos de milho MON810 obtidos usando cinco diferentes protocolos de extração: Gruber (Grub), Mekawi (Mek), Pobozy (Pob), Rocca pH7,4 (Roc7,4) e Rocca pH 10,6 (Roc 10,6). M: marcador de massa molecular conhecida (kDa). C-: extrato protéico de milho isogênico, controle negativo. Cry1Ab: proteína purificada Cry1Ab ativa em diferentes concentrações.81

Figura 19. Rendimento médio da extração da proteína Cry1Ab ($\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca) de folhas de milho MON810 de cinco protocolos de extração. As diferentes letras nas barras representam diferença estatística, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=3$). SD: Desvio padrão. CV: coeficiente de variação.82

Figura 20. Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab nos extratos protéicos de milho MON810 obtidos usando protocolo de Mekawi (2009) modificado (-Mek), original (Mek) e modificado com adição de Triton X-100 (-Mek+Trx). M: Marcador de Massa Molecular (kDa). P: Proteína Cry1Ab ativa. C-: Extrato protéico de milho isogênico, controle negativo.83

Figura 21. Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab nas amostras imunoprecipitadas de milho MON810 (T) e do milho isogênico (NT). As amostras foram incubadas com anticorpo policlonal anti-Cry1Ab/Ac (Ab/Ac) e anticorpo policlonal anti-Cry1Ab (Ab) por 2 h e imunoprecipitadas usando as *beads* magnéticas. M: marcador de massa molecular (kDa). Seta verde indica o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab e a seta vermelha, a proteína Cry1Ab.84

Figura 22. Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab imunoprecipitada de extratos de milho MON810. O extrato foi incubado com anticorpo policlonal anti-Cry1Ab por 1, 2 e 3 horas a temperatura ambiente e em gelo, e imunoprecipitado usando as beads magnéticas. M: marcador de massa molecular (kDa). C-: Controle negativo, amostra de milho isogênico imunoprecipitada. Seta verde indica o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab e a seta vermelha, a proteína Cry1Ab..... 85

Figura 23. SDS-PAGE de proteína Cry1Ab ativa imunoprecipitada. A proteína Cry1Ab ativa foi incubada com anticorpo policlonal anti-Cry1Ab por 3, 4, 5, 6 e 7 horas em gelo, e imunoprecipitada usando as beads magnéticas. M: marcador de massa molecular (kDa). P: Proteína Cry1Ab ativa (2 µg). Ab: Amostra imunoprecipitada sem proteína Cry1Ab. Seta verde indica o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab e a seta vermelha, a proteína Cry1Ab. 86

Figura 24. (A) Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab das amostras imunoprecipitadas de milho MON810 (T) e do milho isogênico (NT). As amostras foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab e imunoprecipitadas usando as beads magnéticas, e posteriormente precipitadas em metanol com acetato de amônio e solubilizadas em tampão uréia/tiouréia. M: marcador de massa molecular (kDa). P: proteína purificada Cry1Ab ativa. A seta vermelha indica à proteína Cry1Ab..... 87

Figura 25. SDS-PAGE das proteínas imunoprecipitadas do milho isogênico (NT) e do milho MON810 (T), precipitadas em metanol com acetato de amônio e solubilizadas em tampão uréia/tiouréia. M: marcador de massa molecular (kDa). Seta verde indica o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab..... 88

Figura 26. Ligand Blot de proteínas de milho com Cry1Ab. A: Incubadas sem proteína Cry1Ab. B: Incubadas com 10ug/ml da proteína purificada Cry1Ab ativa. Linha 1: Amostra protéica de milho MON810 extraída de acordo com o protocolo de Rocca pH 10,6. Linha 2: Amostra protéica de milho MON810 extraída de acordo com o protocolo de Mekawi (2009). Linha 3: Amostra protéica de milho isôgenico extraída de acordo com o protocolo de Rocca pH 10,6. Linha 4: Amostra protéica de milho isôgenico extraída de acordo com o

protocolo de Mekawi (2009). P: proteína ativada Cry1Ab. M: Marcador molecular (kDa).111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eventos de milho GM aprovados no Brasil.	28
Tabela 2. Conteúdo da proteína Cry1Ab em milho MON810.....	39
Tabela 3. Iniciadores utilizados para detecção por PCR do promotor 35S, do gene <i>cryIAb</i> e do gene da zeína.	52
Tabela 4. Composição das misturas das proteínas imunoprecipitadas marcadas com fluoróforos utilizados na análise proteômica.....	68
Tabela 5. Estimação da massa molecular da proteína Cry1Ab em milho MON810 por Western Blot.	76
Tabela 6. Proteína Cry identificada nos spots do gel bidimensional de amostras de milho MON810 (Figura 16A).	79
Tabela 7. Proteínas de milho MON810 (T) e de milho isogênico (NT) imunoprecipitadas no ensaio de imunoprecipitação.....	90
Tabela 8. Proteínas identificadas nas amostras de milho MON810 (T) e isogênico (NT) extraídas de acordo com o protocolo de Mekawi (Mek) ou Rocca pH10,6 (Roc). T*/NT*: possíveis proteínas de milho MON810 e isogênico, extraídas de acordo com o protocolo de Mekawi, que se ligariam a proteína Cry1Ab segundo o ensaio de Ligand Blot de proteínas de milho com Cry1Ab. T ^c : proteínas exclusivas da amostra transgênica. NT ^c : proteínas exclusivas da amostra isogênica.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Eletroforese bidimensional
ABS	Albumina bovina sérica
AC	Adenilato ciclase
ALP	Alcalino fosfatase
ANOVA	Análise de variância
AMPc	adenilato monofosfato ciclase
ANP	Aminopeptidase-N
ATP	adenosina trifosfato
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BBMV	Brush border membrane vesicles
CAD	Proteína do tipo caderina
CaMV 35S	Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
CERA	Center for Environmental Risk Assessment 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHAPS	
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Cry	Proteínas cristais derivadas de <i>Bacillus thuringiensis</i>
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
DIGE	Fluorescence Difference Gel Electrophoresis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
G	Gramas
GDP	guanosina difosfato
GM(s)	Geneticamente modificado(s)
GPI	Glicosil fosfatidilinositol
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IEF	Enfoque isoelétrico

IPG	Immobilized pH gradient
kDa	Kilodalton
kVh	Kilovolts por hora
MS	Espectrometria de massa
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OGM	Organismo(s) geneticamente modificado(s)
P352	Promotor gênico 35 do vírus de mosaico da couve-flor
PBS-T	Tampão fosfato salino – Tween
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Ponto isoelétrico
PKA	Proteína quinase A
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil
mA	Miliampere
ml	Mililitros
mM	Millimolar
MS	Espectrometria de massa
nM	Nanomolar
RLT	Região de ligação da toxina Cry
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletofórese em gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sódio
μg	Micrograma
v/v	v/v volume/volume
w/v	w/v peso/volume
W	W Watts
WB-2D	Western Blot de gel bidimensional
%	% Percentagem média
°C	°C Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivo Principal	47
3.2	Objetivos Específicos.....	47
3.3	Hipóteses.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Material biológico	49
4.2	Detecção do promotor 35S e do gene <i>cry1Ab</i> em milho MON810.....	50
4.3	Comparação de protocolos de extração de Cry1Ab	53
4.3.1	Protocolos de extração da proteína Cry1Ab.....	53
4.3.2	Quantificação da proteína Cry1Ab por Western Blot/Densitometria.....	55
4.4	Caracterização da proteína Cry1Ab	57
4.4.1	Quantificação da proteína Cry1Ab por DAS-ELISA.....	57
4.4.2	Estimação da massa molecular da proteína Cry1Ab.....	59
4.4.3	Estimação do ponto isoeletrico da proteína Cry1Ab por Western Blot do gel bidimensional (WB- 2D).....	60
4.4.4	Análise da proteína Cry1Ab por Espectrometria de massa	62
4.5	Detecção das proteínas que interagem com a proteína Cry1Ab	63

4.5.1	Ensaio de imunoprecipitação da proteína Cry1Ab com possíveis parceiros de interação	63
4.5.2	Ensaio de Ligand Blot de proteínas de milho com a proteína Cry1Ab.....	70
5	RESULTADOS	73
5.1	Detecção do promotor 35S e do gene <i>cry1Ab</i> em milho MON810.....	73
5.2	Caracterização da proteína Cry1Ab.....	74
5.2.1	Quantificação da proteína Cry1Ab por DAS-ELISA	74
5.2.2	Caracterização da proteína Cry1Ab por Western Blot	75
5.2.3	Ponto isoeletrico da proteína Cry1Ab	77
5.3	Comparação de protocolos de extração da proteína Cry1Ab por Western Blot/densitometria.....	80
5.4	Detecção de possíveis proteínas que interagem com a proteína Cry1Ab	83
5.4.1	Ensaio de Imunoprecipitação da proteína Cry1Ab com possíveis parceiros de interação	83
5.4.2	Ensaio de Ligand Blot de proteínas de milho com a proteína Cry1Ab.....	110
6	DISCUSSÃO.....	135
6.1	Quantificação da proteína Cry1Ab por DAS-ELISA	135
6.2	Comparação de protocolos de extração de Cry1Ab.....	138
6.3	Caracterização da proteína Cry1Ab por Western Blot	140
6.4	Ponto Isoeletrico da proteína Cry1Ab	145

6.5	Detecção de possíveis proteínas que interagem com a proteína Cry1Ab	147
7	CONCLUSÕES	155
8	PERSPECTIVAS FUTURAS E SUGERENCIAS FINAIS.	157
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	159
10	APÊNDICE.....	183

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O cultivo de milho transgênico tem aumentado no mundo de 0,3 milhões de hectares em 1996 para 57 milhões de ha em 2013, o que corresponde a aproximadamente 33% da área de cultivos transgênicos. MON810 é o evento de transformação genética com maior número de aprovações no mundo. Variedades de milho contendo este evento atualmente estão sendo cultivados em 23 países e na União Europeia (EU-28) e têm sido utilizadas para a produção de silagem e os grãos para consumo humano e animal.

Este milho transgênico MON810 apresenta resistência a insetos da ordem Lepidoptera, já que tem inserido no genoma o gene *cryIAb* oriundo da bactéria gram positiva *Bacillus thuringiensis*. Esse gene produz uma proteína inseticida de 131kDa, conhecida como proteína Cry ou Bt. A inserção do transgene foi realizada por transformação genética mediante biobalística. Mas no processo de transformação não foi inserido todo o cassete de expressão no genoma de milho, pois só foi integrado o promotor constitutivo 35S e uma parte do gene *cryIAb*; entretanto, o terminador, quem determina o final do processo de transcrição do gene, não foi inserida. Foi reportado anteriormente que este tipo de método de transformação genética cria eventos de inserção complexos com a presença de múltiplas cópias do transgene intato ou fragmentado.

De acordo com o tamanho do gene *cryIab* truncado inserido no genoma do milho, esse deveria expressar uma proteína truncada de 91 kDa. Mas nos estudos realizados com a proteína Cry1Ab de milho MON810 a referida proteína de 91 kDa não foi reportada. Porém, foi revelada a presença da proteína Cry1Ab de 70 kDa, que corresponderia à toxina Cry1Ab ativa, bem como de moléculas com massas moleculares menores a essa, com 42 kDa, 34 kDa e 17 kDa.

24 Introdução e justificativa

Por outro lado, a expressão da proteína Cry1Ab no milho MON810 é variável conforme as partes da planta, os diferentes estádios vegetativos, as diferentes localidades, até mesmo entre plantas crescidas nas mesmas condições. Adicionalmente, estudos de análises comparativas de perfis proteômicos de milho transgênico e do milho isogênico mostraram diferenças na expressão de proteínas.

Geralmente os estudos sobre a proteína Cry1Ab foram realizados usando a proteína Cry1Ab bacteriana e não a proteína transgênica expressa no milho MON810, a partir do pressuposto de que a proteína expressa na bactéria é idêntica a da planta. Mas a proteína expressa em milho varia de 70kDa a 17kDa, enquanto a proteína da bactéria tem 131kDa. Mesmo que esta última seja digerida com tripsina, o produto não será igual ao da planta, porque esse varia conforme a protease usada.

Além disso, existem estudos de efeitos adversos dos milhos Bt como a poluição genética de variedades convencionais, desenvolvimento de resistência de pragas-alvo aos cultivos Bt, efeitos adversos em organismos não alvos, diminuição da abundância de insetos e reações imunológicas por consumo da toxina Cry1Ab, entre outros.

As diferenças encontradas nos perfis proteômicos do milho transgênico e do isogênico, a ausência da proteína Cry1Ab de 91 Kda nos estudos, a presença de proteínas Cry1Ab de tamanhos similares ao núcleo ativo e menores a estes, e as diferenças na expressão da proteína Cry1Ab no milho MON810, dão indícios de que dentro da planta estão acontecendo processos nos quais está envolvida a proteína Cry1Ab. Isto permite levantar a hipótese de que essa proteína poderia estar interagindo com outras proteínas do milho.

Nos últimos anos, vêm sendo utilizadas diversas técnicas para caracterizar proteínas e detectar interações proteína-proteína, como Western Blot, DAS-ELISA, imunoprecipitação, Ligand Blot e Espectrometria de Massa (MS). Mediante o uso destas

25 Introdução e justificativa

técnicas pode-se obter um panorama mais completo do que poderia estar acontecendo dentro da planta e detectar possíveis efeitos inesperados ou não intencionais da presença do transgene.

Neste contexto de incertezas científicas referentes ao milho MON810, no presente estudo foi caracterizada a proteína Cry1Ab expressa em milho MON810 e foram realizados ensaios de imunoprecipitação e Ligand Blot para detectar possíveis interações da proteína Cry1Ab com proteínas de milho.

26 Introdução e justificativa

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae. É uma espécie de grande importância econômica a nível mundial devido às diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal e humana até o uso na indústria de alta tecnologia (EMBRAPA, 2011). O milho é um cereal consumido por suas qualidades nutricionais as quais são comparáveis às do arroz e do trigo, sendo mais rico em lipídeos, ferro, fibras e amido (FAO, 2001).

O milho foi o cereal com maior produção mundial em 2013, com 1017 milhões de toneladas e é o segundo com maior área plantada no mundo, com 184 milhões de hectares (FAO, 2014). Os países com maior produção de milho são os EUA, China, Brasil e Argentina. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial com uma produção de 80 milhões de toneladas (FAO, 2014) e espera-se para a safra 2014/2015 que a produção atinja 78 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2014).

Devido aos avanços da biotecnologia moderna na área agrícola, atualmente se dispõe de milho geneticamente modificado (GM) no mercado. Segundo o “Relatório sobre a Situação Global das Culturas biotecnológicas/GM Comercializadas em 2013”, 32% das lavouras de milho no mundo eram de milho transgênico (JAMES, 2013). O milho GM é a segunda espécie com variedades transgênicas mais cultivada no mundo. Atualmente, 27 países estão o cultivando, entre eles estão os EUA, Brasil, Argentina, sendo o Brasil o segundo país com maior área plantada (JAMES, 2013). Em 2013, o milho transgênico teve o maior número de eventos aprovados (130 eventos), e o evento com maior número de aprovações foi o MON810, aprovado em 23 países e na União Europeia (JAMES, 2013). No Brasil, a comercialização do evento MON810 foi aprovada em 2007. Desse ano até 2014, a Comissão Técnica Nacional de Biotecnologia (CTNBio) aprovou a liberação

28 Revisão bibliográfica

comercial de 20 eventos de milho GM, entre simples e estaqueados (piramidados) (Tabela 1).

Tabela 1. Eventos de milho GM aprovados no Brasil.

Ano de liberação	Evento	Característica
2007	MON810	Resistência a insetos
2008	Bt11	Resistência a insetos
	NK603	Tolerância herbicida
	GA21	Tolerância herbicida
	TC1507	Resistência a insetos
2009	Bt11 x GA21	Tolerância herbicida e resistência a insetos
	MON810 x NK603	Tolerância herbicida e resistência a insetos
	MIR162	Resistência a insetos
	MON89034	Resistência a insetos
	TC1507 x NK603	Tolerância herbicida e resistência a insetos
2010	Bt11 x MIR162 x GA21	Tolerância herbicida e resistência a insetos
	MON89034 x NK603	Tolerância herbicida e resistência a insetos
	MON88017	Tolerância herbicida e resistência a insetos
	MON89034 x TC1507 x NK603	Tolerância herbicida e resistência a insetos
2011	TC1507 x MON810 x NK603	Tolerância herbicida e resistência a insetos
	TC1507 x MON810	Tolerância herbicida e resistência a insetos
	MON89034 x MON88017	Tolerância herbicida e resistência a insetos
2013	TC1507xDAS-59122-7	Tolerância herbicida e resistência a insetos
2014	MIR604	Resistência a insetos
	Bt11xMIR162xMIR604xGA21	Tolerância herbicida e resistência a insetos

Fonte: CTNBio (2014).

O organismo geneticamente modificado (OGM), segundo a Lei n° 11.105/2005, pode ser definido como um organismo cujo material genético (ADN/ARN) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética. Os OGMs têm inserido em seu genoma um ou mais genes, denominados de transgenes, cujas partes oriundas de diferentes indivíduos são recombinadas *in vitro*. A Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)) usa “planta transgênica” para se referir a planta GM, e define a esta como uma planta com um gene ou construção genética introduzida por técnicas moleculares (OECD, 1993a). O termo transgênico foi introduzido por Gordon et al. (1980) para descrever a transformação genética de um rato, ao qual lhe foi inserido uma sequência de DNA no genoma, por isso, no início o termo era usado para animais e depois foi ampliado seu uso para plantas (OECD, 1993a).

A produção de transgênicos é possível mediante a transformação genética, baseada na tecnologia de ADN recombinante (SHARMA et al., 2000). Esta tecnologia possibilita a transferência de genes (de outro organismo) no genoma da planta por via não sexual (COHEN et al., 1973). Deste modo, podem ser obtidas plantas com novas características desejadas (SHARMA et al., 2000). Para a transformação é necessário um vetor que carregue a construção genética que deve ter três elementos básicos: o gene de interesse, o promotor e o terminador. Além disso, a construção genética pode conter um gene marcador ou repórter e outras sequências que potencializem a expressão do gene (SHARMA et al., 2000). Cada célula transformada individualmente produzirá um evento de transformação genética (SAMOLSKI, 2004). Os eventos podem ser simples ou estaqueados (ou empilhados); sendo que estes últimos são definidos “como novos produtos com mais de um evento de transformação” (OECD, 2004).

30 Revisão bibliográfica

Existem vários métodos de transformação genética: mediante *Agrobacterium tumefaciens*, usado para obter os eventos MIR 162, MON 89034 e MON 88017; por electroporação, usado para obter o evento T25; transformação direta de protoplastos, usado para obter o evento Bt11; e por bombardeamento de partículas ou biobalística, usado para obter os eventos MON810, GA21, TC1507 e NK603 (CTNBio, 2014), entre outros. Cada um destes eventos tem uma característica desejada definida pelos proponentes da tecnologia, por exemplo, tolerância a um herbicida (glifosato, glucosinato de amônio) ou resistência à insetos, como no caso dos cultivos Bt (CTNBio, 2014). No Brasil estão sendo cultivados cinco eventos simples de milho Bt (MON810, Bt11, TC1507, MIR604 e MON89034). Os cultivos Bt são feitos com plantas transgênicas que têm um ou mais genes de *Bacillus thuringiensis* inseridos no seu genoma, conferindo-lhe resistência a um tipo de inseto por meio da produção de toxina (SANVIDO et al., 2007)

O *B. thuringiensis* é uma bactéria do solo, que forma uma endospora caracterizada pela acumulação de grandes quantidades de inclusões cristalinas de natureza protéica (DE MAAGD et al., 2001; SANVIDO et al., 2007). Estas inclusões cristalinas são compostas por uma ou mais proteínas cristais (cry), também denominadas δ -endotoxinas, codificadas pelos genes *cry* (BRAVO et al., 2007). Estas proteínas acumulam-se no cristal em forma de protoxinas que estão na forma inativa.

As inclusões cristalinas formam complexos com 20kpb DNA (AI et al., 2013; BIETLOT et al., 1993; CLAIRMONT et al., 1998; GUO et al., 2011; XIA et al., 2005). Antes da esporulação, o DNA começa a se condensar na região onde vai ser formado o esporo e após a formação deste, a fluorescência desaparece dessa região e reaparece onde a inclusão cristalina é montada (BIETLOT et al., 1993). O papel do DNA na inclusão cristalina é facilitar o sequestro das proteínas Cry (protoxina) durante a esporulação (CLAIRMONT et al., 1998) e determinar a estrutura e as propriedades do cristal (BIETLOT et al., 1993). Além disso, foi demonstrado que entre o DNA e a protoxina existe

uma interação específica (BIETLOT et al.,1993) na região N-terminal da protoxina com três nucleotídeos de DNA (CLAIRMONT et al., 1998).

O processo de ativação do complexo cristal-20 kpb DNA em toxina foi proposto por Clairmont et al. (1998). O complexo é ingerido pelo inseto suscetível e solubilizado em complexo protoxina-20kpb DNA dentro do ambiente alcalino do intestino médio para obter uma protoxina solúvel ainda não ativa. As proteases clivam a porção C-terminal da protoxina do complexo convertendo-lo em um complexo de toxina-20kpb DNA. Este é subsequentemente convertido em um complexo de toxina-100pb DNA por ação de nucleases e, finalmente, em toxina livre de DNA (CLAIRMONT et al., 1998). A toxina livre de DNA tem uma estrutura relaxada, que lhe permite ser reconhecida pelo receptor (AI et al., 2013). Foi observado que a associação dela com o DNA oferece estabilidade para não formar agregados, ou seja, evitar a formação de oligômeros da toxina (GUO et al., 2011). Além disso, proporciona à toxina certa proteção contra proteases (GUO et al., 2011).

As protoxinas Cry1 tem uma massa molecular de ~130kDa. O processo de ativação é similar ao explicado anteriormente. Essa protoxinas estão na forma não ativa e para ser ativadas estas são clivadas pelas proteases intestinais do inseto obtendo-se uma toxina ativa de 60-70kDa com atividade inseticida (DE MAAGD et al., 2001), também chamado de núcleo inseticida da proteína. As clivagens da protoxina ocorrem na região C-terminal e N-terminal (Figura 1); sendo que na primeira clivagem é removida grande parte do C-terminal e na segunda é removida uma pequena porção da região N-terminal, dando origem à toxina ativa (RUKMINI et al., 2000).

32 Revisão bibliográfica

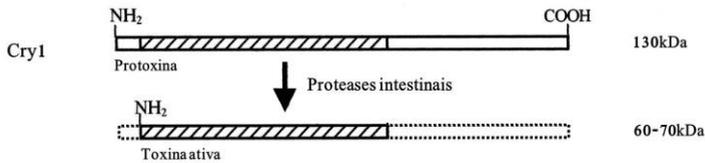


Figura 1. Esquema da ativação da protoxina Cry1. Região pontilhada: representa a região removida pelas proteases (Fonte: RUKMINI et al., 2000).

Para o modo de ação da proteína insecticida Cry em insetos existem dois modelos propostos. O primeiro modelo caracteriza-se pela formação de poros na membrana epitelial de células intestinais. Este modelo envolve interações sequenciais da Cry com várias proteínas do intestino médio do insecto que facilitam a formação de uma estrutura oligomérica e induzem a sua inserção na membrana, formando um poro que mata as células do intestino médio (PARDO-LOPEZ et al., 2013). Para isso, a toxina Cry1 interage com diferentes proteínas presentes nas células intestinais do insecto *Lepidoptera*, tais como proteínas de membrana do tipo caderina (CAD), a aminopeptidase-N (APN) e alcalino fosfatase (ALP) (PIGOTT & ELLAR, 2007; SOBERON et al., 2009). Também foram identificados outros componentes que interagem com as toxinas Cry, como glicolípidos ou proteínas intracelulares (BAYYAREDDY et al., 2009; GRIFFITS et al., 2005; KRISHNAMOORTHY et al., 2007; MCNALL & ADANG, 2003).

O primeiro modelo de modo de ação da proteína Cry no insecto alvo é explicado de forma resumida na Figura 2. A toxina (monomérica) se liga primeiro as proteínas APN e ALP. Essas enzimas estão ancoradas a glicosil fosfatidilinositol (GPI) na membrana. A interação com ALP e APN concentra a toxina em microvilosidades da membrana das células do intestino médio, onde a toxina é, então, capaz de se ligar a epítomos na região extracelular da proteína de membrana CAD (JI et al., 2014; PARDO-LÓPEZ et al., 2013). A interação promove a clivagem

proteolítica da porção N-terminal, incluindo o hélice $\alpha 1$ do domínio I da toxina (ATSUMI et al., 2008; GÓMEZ et al., 2002; PARDO-LÓPEZ et al., 2013). A clivagem da hélice $\alpha 1$ é necessária para ativar a formação do pré-poro, ou seja, a formação de oligômeros da toxina (ARENAS et al., 2010; GÓMEZ et al., 2002; PACHECO et al., 2009). Foi observado que a presença de CAD com epítopos para Cry1Ab aumentava a toxicidade de Cry1Ab na larva (CHEN et al., 2007). O aumento foi correlacionado com a alta formação de oligômeros Cry1Ab (PACHECO et al., 2009a). A formação dessa estrutura oligomérica já foi demonstrada para uma grande quantidade de proteínas Cry: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry3 e Cry8Ea1 (GÓMEZ et al., 2002; GUO et al., 2011; MUÑOZ-GARAY et al., 2006; RAUSELL et al., 2004a).

Em seguida, os oligômeros (pre-poros) se ligam às proteínas APN e ALP, as quais induzem a inserção do pré-poro na membrana, permitindo a formação do poro e, finalmente, a lise celular, o que leva à paralisia ou à morte do inseto por septocemia (PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

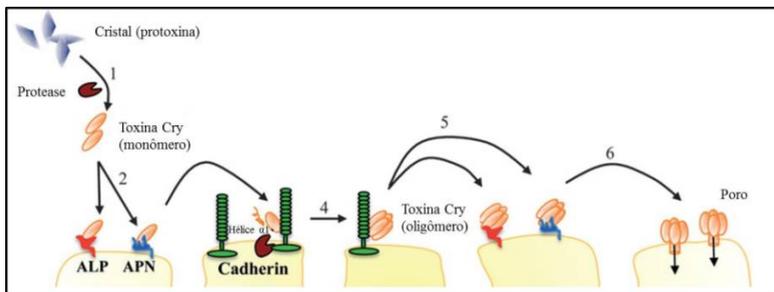


Figura 2. Esquema do mecanismo de ação das proteínas Cry em Lepidópteros. (1) Solubilização e ativação da toxina. (2) Ligação da toxina monomérica Cry às proteínas ALP e APN. (3) A toxina monomérica Cry se liga ao receptor CAD e induz a clivagem da hélice $\alpha 1$. (4) Oligomerização da Cry. (5) O oligômero de Cry se liga às proteínas ALP e APN. (6) Inserção do pré-poro na membrana causando a formação do poro. (Fonte: PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

34 Revisão bibliográfica

O segundo modelo proposto por Zhang et al. (2006) caracteriza-se pela transdução de sinais (Figura 3). A toxina Cry se liga à CAD, sendo que esta ligação desencadeia uma via intracelular que resulta na ativação da proteína G, a qual aciona a adenilato ciclase (AC), responsável pela produção de AMPc (adenosina monofosfato cíclico). Os níveis de AMPc aumentam e ativam a proteína quinase A (PKA). A indução dessa leva a uma sequência de alterações citológicas que incluem formação de bolhas na membrana, a aparição de núcleos fantasmas e inchaço celular, levando à morte celular sem envolver formação de oligômeros, de poros e sem participação de outras proteínas receptoras.

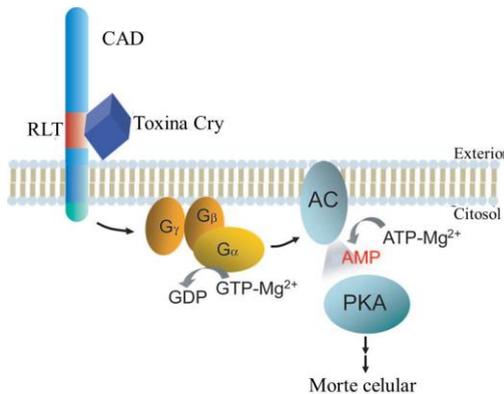


Figura 3. O modelo proposto para a ação da toxina Cry por Zhang et al. (2006). A toxina Cry se liga à proteína do tipo caderina (CAD) e estimula a proteína G e adenilato ciclase (AC), que promove a produção de intracelular adenilato monofosfato ciclase (AMPc). Por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA) que desestabiliza os canais do citoesqueleto e íons, levando à morte celular. RLT: região de ligação da toxina Cry; GDP: guanosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato.

Em ambos dos modelos, as proteínas CAD são as primeiras receptoras que dão início ao mecanismo de ação das toxinas Cry nos insetos. Estas proteínas são consideradas importantes porque estão relacionadas com a resistência dos insetos à proteína Cry (GAHAN et al., 2001; JI et al., 2014; XIE

et al., 2005; XU et al., 2005;). A resistência deve-se a alterações nas CADs que podem ser a mutação do gene CAD, tais como inserção ou deleção (JI et al., 2014; XIE et al., 2005), alteração da expressão do gene CAD (JI et al., 2014), ou por disrupção do gene CAD (GAHAN et al., 2001; XU et al., 2005). Um dos mecanismos mais importantes de resistência de insetos às proteínas Cry é devido à mutação da CAD no intestino médio do inseto na região de ligação afetando, assim, a ligação da toxina Cry, como foi observado em *Furnacalis ostrinia* que é uma praga de milho que desenvolveu resistência à Cry1Ac (JI et al., 2014).

As proteínas Cry expressas pelos genes *cry* têm uma estrutura tridimensional semelhante que está conformada por três domínios (BOONSERM et al., 2006; GROCHULSKI et al., 1995) (Figura 4). O domínio I compreende sete α -hélices, denominadas $\alpha 1$ - $\alpha 7$. Este domínio é o responsável pela formação do poro (SCHWARTZ et al., 1997) e inserção na membrana (ZAVALA et al., 2011). Os domínios II e III compostos de β -folhas, são responsáveis pelo reconhecimento e ligação ao receptor (DE MAAGD et al., 1996)e, portanto, determinam a especificidade da proteína Cry (GOMEZ et al., 2006). O domínio II compartilha a mesma estrutura tridimensional de três proteínas que ligam carboidratos, as lectinas de plantas: jacalina de *Moraceae*, aglutinina de *Maclura pomifera*, lectina de *Helianthus tuberosus* (BOONSERM et al., 2006; BOURNE et al., 1999; PIGOTT et al., 2007; SARASWATHY & KUMAR et al., 2004).

36 Revisão bibliográfica

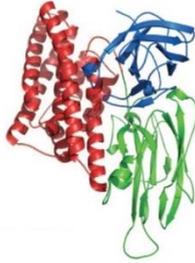


Figura 4. Representação esquemática da estrutura da toxina Cry1A. O domínio I, II e III estão mostrados em vermelho, verde e azul, respectivamente. (Fonte: PIGGOT et al., 2007).

A proteína Cry1Ab produzida pelo gene *cry1Ab* da bactéria *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* forma inclusões cristalinas piramidais (RODRÍGUEZ-ALMAZÁN et al., 2009). Sua atividade tóxica é contra insetos da ordem *Lepidoptera* (BRAVO et al., 2007; JIMÉNEZ-JUÁREZ et al., 2008). Este gene foi extraído de *B. thuringiensis*, geneticamente modificado *in vitro* e inserido em células de milho, originando o evento de transformação genética denominado de MON810 (BRASIL, 2007a).

O evento MON810, comercializado com o nome de milho Yieldgard, foi desenvolvido pela empresa MONSANTO mediante biobalística (BRASIL, 2007a). O processo de transformação genética consistiu no bombardeamento do material vegetal com partículas revestidas com o material genético de interesse (BRASIL, 2007a; HOLCK et al., 2002). O evento MON810 tem inserido o gene *cry1Ab* sob controle do promotor transcricional 35S e um íntron de 0,8 kb proveniente do gene *hsp70* do milho (BRASIL, 2007a). As análises posteriores à transformação indicaram que a inserção do gene *Cry1Ab* do evento MON810 ocorreu de forma incompleta devido à perda da região 3' da construção original (HERNANDEZ et al., 2003) (Figura 5). É importante mencionar que a sequência foi modificada para otimizar os códons do organismo receptor (BRASIL, 2007a) e a inserção incompleta se deve à natureza do

processo de transformação, em que geralmente ocorrem rearranjos (HERNANDEZ et al., 2003; ROSATI et al., 2008).

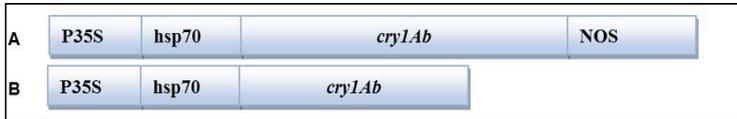


Figura 5. (A) Representação esquemática do cassete usado na transformação do evento MON810. (B) Representação esquemática do inserto no evento MON810. P35S: promotor 35S CaMV do vírus do mosaico da couve-flor, hsp70 : Íntron de proteína de choque térmico hsp70 de milho, *cry1Ab*: gene da proteína Cry1Ab de *B. thuringiensis*, NOS: terminador de nopalina sintase.

A proteína Cry1Ab, naturalmente expressa em *B. thuringiensis*, é encontrada em sua forma completa de pró-toxina, de massa molecular de 131 kDa e, após ser ingerida pelo inseto, gera a toxina de aproximadamente 65kDa (GUIMARÃES et al., 2010). No entanto, como o evento MON810 possui uma versão truncada do gene *cry1Ab*, devido a rearranjos que ocorreram na transformação genética (HERNANDES et al., 2003), a proteína expressa teria um tamanho molecular de 91kDa (CERA, 2014) (Figura 6). Apesar dos rearranjos na transformação, a proteína Cry1Ab truncada de milho MON810 não perdeu a sua atividade inseticida (HERNANDES et al., 2003).

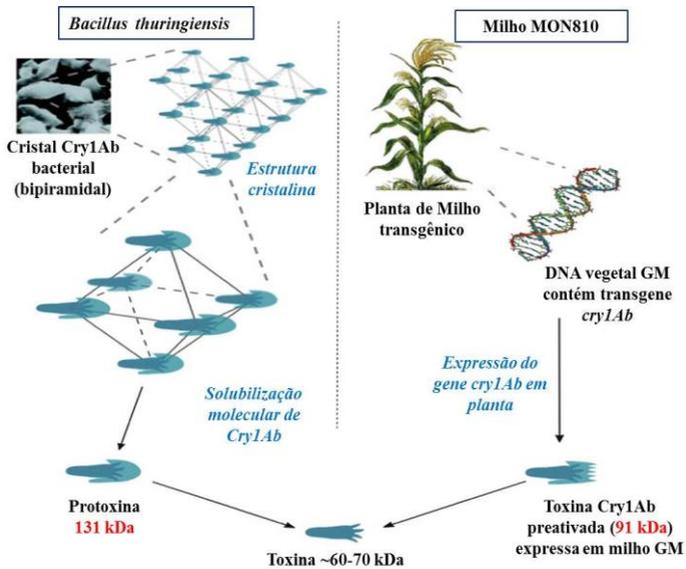


Figura 6. Representação esquemática das diferentes formas de ativação da proteína Cry1Ab em preparações Bt bacterianas (à esquerda) e os cultivos Bt (à direita). (Fonte: SZÉKÁCS & DARVAS, 2012).

A caracterização da proteína Cry1Ab expressa em milho MON810 mediante Espectrometria de massa revelou que a proteína Cry1Ab tem uma massa molecular de aproximadamente 69 kDa (MEKAWI, 2009). Gruber et al., (2011) e Paul et al. (2010) analisaram a proteína Cry1Ab expressa em milho MON10 por Western Blot, revelando a proteína Cry1Ab de 65kDa e a presença de tamanhos menores do que o esperado, 42 kDa, 34 kDa e 17 kDa. De Luis et al. (2010) extraiu proteína Cry1Ab de milho MON810 e analisou por Western Blot, mostrando várias bandas imunorreativas correspondentes à proteína Cry1Ab, variando de 17kDa a 70kDa. Posteriormente, os mesmos autores analisaram os fragmentos do SDS-PAGE por Espectrometria de massa e confirmaram que as bandas imunorreativas detectadas correspondiam à Cry1Ab de *B. thuringiensis* (DE LUIS et al., 2010).

Além de determinar o tamanho molecular da proteína Cry1Ab, Mekawi (2009) observou que o ponto isoelectrico (PI) da proteína truncada de 68,9kDa é igual a 6,5. Os outros trabalhos reportados sobre o ponto isoelectrico da proteína Cry1Ab da toxina (65 kDa) foram realizados com proteína de *B. thuringiensis* ou com o auxílio de programas para calcular o PI, dando diferentes valores do PI, 5,5, 10,7 e 6,4 (BIETLOT et al., 1989; HUANG et al. 2004; SANDER et al., 2010; YAMAMOTO & MC LAUGHLIN, 1981).

A expressão da proteína Cry1Ab no milho MON810 é variável (Tabela 2), por isso a concentração da proteína Cry1Ab tem sido avaliada em alguns estudos (ABEL & ADAMCZYK, 2004; NGUYEN & JEHLE, 2007; SZÉKÁCS et al., 2010a; SZÉKÁCS et al., 2010b; SZÉKÁCS et al., 2012; THEN & LORCH, 2008).

Tabela 2. Conteúdo da proteína Cry1Ab em milho MON810.

Cultivar	Conteúdo da proteína Cry1Ab (ng /g massa fresca)	Referência
?	12500 -72000*	SZÉKÁCS et al., 2012.
DK-440 BTY	3800-11400	SZÉKÁCS et al., 2010 ^a
DK-440 BTY	9160-17150	SZÉKÁCS et al., 2010b
Monsanto Novelis	316-11070	NGUYEN & JEHLE, 2007
AgriGold A6609Bt	760-2300	ABEL & ADAMCZYK, 2004
Agro RX799Bt	770-2390	ABEL & ADAMCZYK, 2004
Pioneer P31B13Bt	660-2200	ABEL & ADAMCZYK, 2004
Pioneer P33V08Bt	660-2170	ABEL & ADAMCZYK, 2004
?	7590 -9390	AGBIOS 2002 citado por SZÉKÁCS et al., 2010b
?	7930- 10340	SANDERS et al., 1995
?	0-14800	THEN & LORCH, 2008

*Massa seca. ?: Não especificado o cultivar.

A variação da expressão de Cry1Ab foi encontrada em plantas individuais da mesma variedade transgênica MON810 que cresceram nas mesmas condições e foram coletadas no

40 Revisão bibliográfica

mesmo dia (NGUYEN & JEHLE, 2007; THEN & LORCH, 2008). Também foi observado que a expressão da proteína depende das condições ambientais (NGUYEN & JEHLE, 2007). A quantidade de proteína também pode variar dependendo do tecido. Por exemplo, na folha há maior quantidade da proteína Cry1Ab do que na raiz (NGUYEN & JEHLE, 2007; SZÉKÁCS et al., 2010b), mesmo que o promotor inserido no evento seja um promotor constitutivo 35S.

Há também relatos sobre os efeitos adversos da proteína Cry1Ab. Hilbeck et al. (1998) estudaram a toxicidade da toxina Cry1Ab em um agente de controle biológico *Chrysoperla carnea*. O estudo demonstrou que 57% das larvas de *C. carnea* morreram quando alimentadas com uma dieta contendo toxina Cry1Ab.

Em um estudo com camundongos alimentados com milho GM MON863, observou-se que eles mostraram-se fracos, com sinais de toxicidade hepatorenal, com 24-40% de aumento dos triglicerídeos nas fêmeas e diminuição de 31-35% da excreção de sódio e fósforo na urina em machos (SERALINI et al., 2007).

Abelhas (*Apis mellifera*) expostas a diferentes concentrações da proteína Cry1Ab (3 e 5000 ppb) mostraram comportamento alterado depois de expostas a maior concentração de proteína Cry1Ab e levavam mais tempo para absorver o xarope contaminado com a proteína Cry1Ab (RAMIREZ-ROMERO et al., 2008).

Um estudo ecotoxicológico com *Daphnia magna* alimentada com milho MON810 demonstrou que esta sofre uma redução significativa do valor adaptativo (*fitness*) comparado com as alimentadas com o milho isogênico. A mortalidade dela foi maior, a proporção de fêmeas que alcançaram a maturação sexual foi menor e a proporção de ovos foi menor em comparação a *D. magna* alimentada com milho isogênico (BØHN et al., 2008). Bøhn e colaboradores (2010) realizaram outro estudo com a mesma espécie alimentada com milho

MON810. Os autores observaram que nas populações de *D. magna* alimentadas com ração contendo milho GM a taxa de crescimento, sobrevivência e a fecundação nos primeiros estágios de vida foram desfavorecidas.

Além dos estudos da toxicidade da toxina Cry1Ab, observou-se o efeito ecológico em organismos não-alvos (ONA). Uma meta-análise de 42 experimentos de campo indicou que certos grupos de invertebrados não-alvos são mais abundantes em campos controle sem inseticida do que em campos com algodão Bt e milho Bt (MARVIER et al., 2007).

A longo prazo os cultivos Bt trazem efeitos ecológicos sobre ONA. Observou-se em testes de campo realizados há mais de 10 anos no norte da China, que os percevejos (Heteroptera: Miridae) aumentaram progressivamente os tamanhos populacionais e adquiriram o *status* de praga nas culturas de algodão e em outras culturas, em associação ao aumento da adoção do algodão Bt na região (LU et al., 2010).

Dentre os efeitos ambientais que os OGM podem causar, está a poluição genética (NODARI & GUERRA, 2003). Dentre dezenas de constatações de contaminações cabe mencionar duas delas. No Uruguai, reportou-se polinização cruzada entre milho MON810 e milho convencional à distância de 100 metros e 330 metros (GALEANO et al., 2011), sendo 100 metros a distância mínima exigida para a coexistência de lavouras GM e não GM estabelecida em diversos países, inclusive no Brasil (BRASIL, 2007b). De mesmo modo, foi encontrada a presença de transgenes em populações de milhos crioulos cultivadas nas montanhas de Oaxaca, México (QUIST & CHAPELA, 2001).

Para a avaliação de possíveis efeitos dos OGM, a abordagem comumente empregada pelos proponentes da tecnologia ou mesmo de legislação de alguns países, é a equivalência substancial. O conceito foi desenvolvido com uma abordagem para a avaliação da segurança de alimentos GM e não para caracterizar riscos (OECD, 2006). Embora nunca

42 Revisão bibliográfica

objetivamente definido, o conceito de equivalência substancial envolve uma análise da característica e composição (perfil dos principais nutrientes e substâncias), a ingestão esperada e o papel do novo alimento na dieta, dos cultivos GM e sua contraparte não GM (CELLINI et al., 2004; OECD, 1993b). Esta abordagem tem sido alvo de críticas, entre outras, porque a falta de critérios mais rigorosos pode ser útil à indústria, mas é inaceitável do ponto de vista do consumidor e da saúde pública (MILLSTONE et al., 1999). Além disso, a equivalência substancial não é suficientemente abrangente para prever os efeitos não intencionais e não elimina a ocorrência de efeitos a longo prazo (LU et al., 2010; SÉRALINI et al., 2012).

No entanto, as técnicas que analisam o perfil molecular (*molecular profiling*) do OGM facilitam uma análise comparativa mais completa, científica e holística. Esta abordagem envolve diversas tecnologias como proteômica, micro-arranjos de DNA (*DNA microarrays*), perfis de mRNA e metabolômica; as quais são ferramentas complementares para a avaliação de risco de OGMs. A combinação destes testes dá uma compreensão mais abrangente do sistema e, deste modo, oferece oportunidades para a identificação de efeitos indesejados (CELLINI, et al. 2004; ZOLLA et al., 2008). Nos últimos anos, têm sido realizados estudos que comparam OGM e seu isogênico utilizando análises de perfil molecular através de metabolômica (BAKER et al., 2006), transcriptômica (COLL et al., 2008, 2009) e proteômica (BARROS et al., 2010; ZOLLA et al., 2008,).

A realização dessas avaliações é importante já que na transformação genética o sitio de inserção do transgene não pode ser pré-determinado (TZFIRA et al., 2004), pois os transgenes podem ser inseridos em regiões genômicas funcionais, perturbando a estrutura e /ou alterando os padrões de regulação dos genes no genoma da planta hospedeira (FORSBACH et al., 2003; SZABADOS et al., 2002).

Os estudos de proteômica, juntamente com outros métodos servem para estudar alterações na expressão de genes, a

expressão da proteína, a potencial mudança nos padrões de metabólitos primários e secundários das plantas e fornece informações que são absolutamente cruciais para uma solução científica do problema da biossegurança de alimentos (CELLINI et al., 2004; CORPILLO et al., 2004; ZOLLA et al., 2008). A abordagem mais utilizada para comparar proteomas de plantas é a eletroforese bidimensional (2DE) junto com a Espectrometria de massa, quando o objetivo é identificar proteínas diferencialmente expressas (GARCÍA-CAÑAS et al., 2011; ZOLLA et al., 2008) .

Zolla et al. (2008) realizaram análise do perfil proteômico de grãos de milho MON810 e de seu isogênico e encontraram diferenças na expressão de 43 proteínas, das quais 14 tiveram menor expressão, 13 tiveram maior expressão, nove foram ausentes e sete foram expressas só nas plantas transgênicas. O estudo de Coll et al. (2011) também demonstrou que houve diferença na expressão de 10 proteínas comparando duas variedades de milho MON810 versus seus dois isogênicos.

No Brasil, tem sido realizadas análises proteômicas para a avaliação dos possíveis efeitos indesejáveis dos OGMs. Brandão et al. (2010) realizaram a análise proteômica de soja GM e não GM, encontraram 10 *spots* diferenciais. Balsamo et al (2011) analisaram os perfis proteômicos de quatro variedades MON810 e seus isogênicos, e observaram que a presença exclusiva de *spots* não foi constante entre variedades MON810 e suas isolinhas, indicando que diferenças encontradas nos perfis avaliados poderiam estar não relacionadas ao evento MON810.

No estudo de Barros et al. (2010) foram encontradas três proteínas diferenciais quando se comparou um milho híbrido não transgênico com dois híbridos comerciais de milho transgênico de semelhante *background* genético, cultivados em campo com coletas em três safras consecutivas. Dentre estes, três tiveram maior expressão em evento MON810 e um teve menor expressão em evento NK603.

44 Revisão bibliográfica

Em outro estudo, Agapito-Tenfen et al. (2013) avaliaram a expressão de proteínas totais de um híbrido transgênico (evento MON810) e sua isolinha convencional em diferentes agroecossistemas. Os autores verificaram na análise comparativa dentro de cada ambiente um total de 32 proteínas diferencialmente expressas entre as plantas transgênicas e convencionais. No referido estudo, a identificação das proteínas e suas funções biológicas estavam relacionadas ao metabolismo energético, processamento de informação genética e resposta a estresse.

As diferenças nos perfis proteômicos de milho MON810 e do milho isogênico, e a presença de tamanhos moleculares da proteína Cry1Ab menores a 91 kDa (42 kDa, 34 kDa e 17 kDa), forneceriam indícios de que a proteína Cry1Ab estaria interagindo com outros químicos da planta (ANDOW & HILBECK, 2004). Já foi reportado que a proteína Cry pode se ligar a proteínas não relacionadas ao intestino médio do inseto (DU & NICHESON et al., 1996; KITAMI et al., 2011; SANCHIS & ELLAR, 1993). As proteínas que podem se ligar à proteína Cry são proteínas de diferentes origens, vegetal, animal ou bacteriana (KITAMI et al., 2011). Também foi encontrado que a Cry pode se ligar à B-galactosidase, a qual é usada como marcador molecular de proteína no SDS-PAGE (SANCHIS & ELLAR, 1993).

As interações de proteína-proteína são intrínsecas a praticamente todos os processos celulares (replicação de DNA, transcrição, tradução, splicing, transdução de sinais, etc.) (PHIZICKY & FIELDS, 1995). Um método para identificar proteínas que interagem é o de Imunoprecipitação, seguida da eletroforese bidimensional (2DE) ou SDS-PAGE e Espectrometria de massa (BERGGÅRD et al., 2007; FREE et al., 2009; HAVE et al., 2011; TRINKLE-MULCAHY et al., 2008). Há estudos da interação da proteína Cry1Ab com receptores moleculares usando a técnica de imunoprecipitação (BRAVO et al., 2004; MAATY, 2004). A imunoprecipitação com *beads*

magnéticos consiste em método promissor para detecção de proteínas Cry1Ab, já que é de fácil adaptação e simples (LI et al., 2011).

Por outro lado, o método de Ligand Blot também é extensamente usado para poder identificar ligações de proteínas. Ele tem sido usado em vários estudos de detecção de receptores de membrana da proteína Cry1Ab presentes em insetos alvos (ARENAS et al., 2010; CACCIA et al., 2012; FLORES-ESCOBAR et al., 2013; SHIMADA et al., 2006).

Este tipo de estudo oferece uma abordagem molecular para avançar na compreensão de efeitos pleiotrópicos desencadeados pela presença de transgene no hospedeiro. Assim, é oportuno avaliar a interação da proteína Cry1Ab com as proteínas do milho MON810 e caracterizar a proteína Cry1Ab, contribuindo, assim, com o avanço no conhecimento científico sobre as implicações da transgenia.

46 Revisão bibliográfica

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

- ✓ Detectar as possíveis interações da proteína Cry1Ab com as proteínas endógenas de milho.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar a proteína Cry1Ab no milho MON810 por meio da técnica de Western Blot (1D e 2D) e Espectrometria de massa;
- ✓ Quantificar e comparar o conteúdo da proteína Cry1Ab no limbo e na bainha da folha de milho MON810 mediante DAS-ELISA;
- ✓ Detectar as possíveis interações da proteína Cry1Ab com proteínas de milho híbrido através de ensaios de Imunoprecipitação e Ligand Blot;
- ✓ Identificar as possíveis proteínas associadas à proteína Cry1Ab com proteínas de milho através de Espectrometria de massa;
- ✓ Comparar os rendimentos de extração da proteína Cry1Ab de cinco protocolos de extração.

3.3 Hipóteses

- ✓ Existem diferenças entre as concentrações da proteína Cry1Ab no limbo e na bainha de folhas de milho MON810;
- ✓ Existem diferentes tamanhos da proteína Cry1Ab no milho MON810;
- ✓ Existe interação da proteína Cry1Ab com as proteínas endógenas do milho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Grande parte das atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). E outra parte das atividades, como os testes de DAS-ELISA e os ensaios de Ligand Blot, foram realizados no Centro de Biossegurança (GenØk) na Noruega.

4.1 Material biológico

No presente estudo foram usadas duas variedades de milho: o milho híbrido GM AG5011YG, que contém o transgene *cryIAb* que expressa a proteína Cry1Ab, e a sua linha isogênica, o milho híbrido AG5011. Sementes de ambas as variedades foram produzidas pela empresa Agrocere e adquiridas em casa comercial de sementes.

Para os experimentos foram utilizadas folhas (limbo) de milhos de 12 dias após a semeadura. As sementes foram colocadas de forma casualizada em bandejas plásticas (30 células) com substrato comercial dentro de uma Estufa Incubadora Microprocessada para BOD (demanda bioquímica de oxigênio) sob condições controladas (fotoperíodo 16h, temperatura: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 12 dias, sendo que no quarto dia as plântulas foram regadas com solução nutritiva (Figura 7A). No 12º dia após a semeadura as folhas foram coletadas, pesadas e armazenadas no freezer a -80°C até o momento da análise.

No entanto, para o teste DAS-ELISA e os ensaios de Ligand Blot, as plantas foram crescidas em uma sala de crescimento, mas as condições de temperatura, luz, irrigação, solução nutritiva e tempo foram as mesmas aplicadas as plantas crescidas na BOD e usadas nas demais avaliações (Figura 7B).

As plantas de milho com 12 dias, estágio de desenvolvimento V2, segundo os estádios definidos por Ritchie et

50 Material e métodos

al. (1992), as quais possuem três folhas, sendo que a segunda folha tem o colar da bainha visível.



Figura 7. Plantas de milho MON810 e milho isogênico de 12 dias após semeadura, crescidas em Estufa Incubadora Microprocessada para BOD (A) e em um quarto de crescimento (B).

A proteína purificada Cry1Ab ativa, usada como controle, foi obtida na forma liofilizada da Professora Marianne Pusztai-Carey do Departamento de Bioquímica da Universidade Case Western Reserve, Cleveland (EUA). A proteína foi preparada a partir da pró-toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* expressa como um produto de um único gene embebido em *Escherichia coli*, por clivagem enzimática com tripsina, purificada por HPLC e liofilizada.

4.2 Detecção do promotor 35S e do gene *cryIAb* em milho MON810.

Para confirmar a presença do transgene (gene *cryIAb* e do promotor 35S) no milho MON810 foram utilizadas as folhas de três *pools* de milho MON810 e outros três *pools* de milho da linha isogênica; sendo cada *pool* foi constituído de 10 plantas.

A detecção dos transgenes foi realizada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Além dos transgenes foi amplificada uma parte da sequência do gene endógeno do milho (zeína) como controle interno para confirmar que o material usado era de milho e evidenciar a presença do DNA amplificável. Para garantir os resultados, em uma reação foi usada água ao invés de DNA e dois controles: controle negativo (DNA de milho isogênico) e positivo (DNA de milho MON810). As folhas de cada variedade foram agrupadas em três grupos, tendo um total de seis grupos. A Figura 8 mostra um resumo da metodologia usada para a detecção dos transgenes.

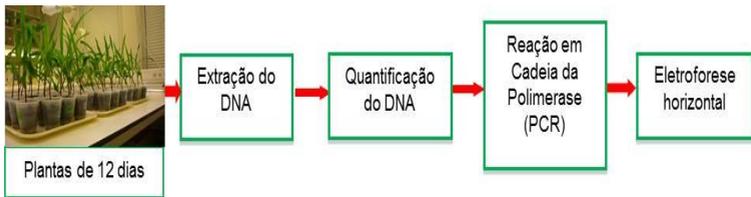


Figura 8. Esquema da metodologia usada para conferir a presença dos transgenes (P35S e *cry1Ab*) e do gene da zeína.

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o método CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) descrito por Doyle e Doyle (1999). A concentração e a pureza de DNA extraído foram analisadas visualmente por eletroforese em gel de agarose e no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) através da absorbância a 260 nm. Os pares de iniciadores de PCR usados para amplificação do promotor 35S, do gene *cry1Ab* e do gene da zeína são apresentados na Tabela 3.

52 Material e métodos

Tabela 3. Iniciadores utilizados para detecção por PCR do promotor 35S, do gene *cryIAb* e do gene da zeína.

Iniciador	Sequência (5' a 3')	Tamanho do Amplicon	Referências
P35S -F	CCACGTCTCA AAGCAAGTGG	123bp	LIPP et al., 2001
P35S-R	TCCTCTCCAAA TGAAATGAAC TTCC		
<i>cryIAb</i> - F	TCGCAGCGCG GAGTTCAACA AT	1023bp	SARAH ZANON AGAPITO TENFEN
<i>cryIAb</i> - R	TGGTGGGCAC ACTTGCCGAT		
Zeína- F	TGCTTGCATG TTCGCTCTCCT AG	329bp	MATSUOKA et al., 2000 CARDARELLI et al., 2005
Zeína- R	GTCGCAGTGA CATTGTGGCAT		

A PCR foi realizada no termociclador Veriti™ (Applied Biosystems) em um volume final de 20 µL, contendo 50 ng de DNA, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Genet Bio), 1X tampão de PCR (Tris-HCl pH 9,0, (NH₄)₂SO₄, 20mM MgCl₂)(Genet Bio), 400 µM de dNTPs e 0,2 µM do iniciador zeína-F/zeína-R, 0,8 µM P35S-F/P35S-R e 0,5 µM *cryIAb*-F/*cryIAb*-R. No caso da PCR com os iniciadores do gene *cryIAb* foram usados 200 µM de dNTPs.

As condições da PCR para os três pares de iniciadores foram: desnaturação inicial a 98°C por 30 s; seguida de 30 ciclos compreendendo: 98°C por 10 s, 57°C por 30 s (anelamento) e 72°C por 30 s (extensão); amplificação final a 72°C por 10 min e 4°C por 2 h. Os produtos de PCR foram analisados através da técnica de eletroforese em um gel de agarose de 1%, corados com GelRed e utilizou-se o marcador 1 kb DNA ladder e 100pb. Na corrida eletroforética foi aplicado 100 V por 30 min e a

visualização foi realizada em transluminador *DigiDoc-It System* (Ultra-Violet Products).

4.3 Comparação de protocolos de extração de Cry1Ab

Foram comparados cinco protocolos de extração de proteínas para saber qual é o mais eficiente em extrair a proteína Cry1Ab de milho MON810. Para isso foram testados cinco protocolos de extração: três estão descritos na literatura; o protocolo de Gruber et al. (2011), Pobozy et al. (2013) e Mekawi (2009). Os outros dois foram desenvolvidos pelo Centro de Biosegurança-GenØk (Noruega) por Elena Rocca.

4.3.1 Protocolos de extração da proteína Cry1Ab

Para cada protocolo foram utilizados três *pools*, contendo folhas (limbos) de 10 plantas cada um, obtendo-se um total 15 extratos protéicos. No teste foram usados *pools* de plantas ao invés de plantas individuais para evitar a variação do conteúdo da proteína Cry1Ab que se apresenta entre indivíduos de milho MON810. Para que os protocolos de extração pudessem ser comparáveis foram feitas algumas modificações nos protocolos, como usar o mesmo radio de diluição na extração (1g material vegetal: 10 ml tampão de extração) e colocar PMSF no tampão de extração para inibir a ação das proteases.

No primeiro protocolo, as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido até obter um pó fino e extraídas com agitação constante em um radio de 1:10 (peso: volume) no tampão de extração (50 mM CAPS, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA e 2 mM DTT e cocktail de inibidor de protease a pH 10,8). Após a maceração, as amostras foram deixadas agitando em gelo por 30 min. Posteriormente, foram centrifugadas a 15000 g (Centrifuga Refrigerado 5810R, Eppendorf) por 10 min a 5°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -20°C até a análise. Este protocolo foi descrito por Mekawi (2009).

54 Material e métodos

O segundo protocolo utilizado foi descrito por Gruber et al. (2011). As proteínas foram maceradas e extraídas em tampão de extração gelado (8 mM NaH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,1% de Tween 20 (v/v), 1mM PMSF a pH 7,4) com ajuda do Precellys®24 (Bertin Technologies). Previamente, em microtubos de 2 ml (self-standing Micro Tube, Bertin Technologies) foram colocados aproximadamente 100 mg de amostra, 1 ml de tampão de extração e 200 mg de *beads* de cerâmica (Bertin Technologies), e homogeneizados 5 vezes durante 20 s com um passo de esfriamento de 5 min em gelo entre cada ciclo de homogeneização. Depois, foram mantidos em agitação constante por 30 min em gelo. Após agitação, foram centrifugados a 15000g a 4°C por 15 min e 500 µl do sobrenadante foi coletado e submetido a uma segunda centrifugação para obter um extrato mais limpo o qual foi armazenado a -20°C.

O terceiro protocolo foi descrito por Pobozy et al. (2013). As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e extraídas em uma proporção 1:10 (peso: volume) em um tampão de extração (50 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl, 2% CHAPS (w/v) e 1 mM PMSF). A mistura foi agitada em gelo por uma hora. Posteriormente, foi ultrasonificada por 5 min e centrifugada a 15000 g por 5 min a 4°C. As alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C.

O quarto protocolo foi desenvolvido pelo Centro de Biosegurança- GenØk (Noruega) por Elena Rocca (trabalho não publicado). Assim como nos demais outros protocolos, as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e extraídas em um tampão de extração frio (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1,5% Triton X-100 (v/v), 1 mM PMSF) em uma proporção de 1:10 e agitadas por 45 min em gelo. Após, foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 min a 4°C. Foi coletado o sobrenadante e guardado a -20°. Este protocolo é denominado Rocca pH 7,4 no presente texto.

O quinto protocolo é similar ao quarto protocolo, com a diferença de que neste o pH da solução 20 mM Tris-HCl foi de 10,6. Este protocolo é denominado Rocca pH 10,6 no presente texto.

As proteínas totais dos extratos protéicos foram quantificadas utilizando-se 2D-Quant Kit (GE Healthcare), usando como padrão a albumina bovina sérica (BSA) fornecida no *kit*. As amostras e o padrão foram quantificados em duplicatas e a absorbância foi lida a 480 nm em espectrofotômetro.

4.3.2 Quantificação da proteína Cry1Ab por Western Blot/Densitometria

Para estimar a concentração da proteína Cry1Ab nos extratos protéicos foi usada a técnica de Western Blotting. Como controle negativo foi usado um extrato protéico da linha isogênica e como padrão, a proteína Cry1Ab ativa, purificada de *E. coli*, em diferentes concentrações: 25, 10 e 2,5 ng/ul.

As amostras foram separadas em géis de poli(acrilamida) 12% de 0,75 mm de espessura, formado por duas partes: gel de empilhamento e de separação. O gel de separação contém 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 12% acrilamida (w/v), 0,4% bisacrilamida (w/v), 0,1% SDS (w/v), 0,05% persulfato de amônio (w/v) e 0,05% Temed (v/v) e o gel de empilhamento contém 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% acrilamida (w/v), 0,13% bisacrilamida (w/v), 0,01% SDS (w/v), 0,05% persulfato de amônio (w/v) e 0,1% Temed (v/v). Amostras foram preparadas pela adição de 12 µl de amostra e 3 µl de tampão de amostra (10% glicerol (v/v), 2% SDS (w/v), 0,05% azul de bromofenol (w/v), 250 mM DTT e 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8) , aquecidas por 5 min a 95°C e carregadas no gel juntamente com o marcador de massa molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad). A corrida foi realizada no sistema MINI PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) a 30V/gel por 15 min e 60V/gel por 90 min. Os géis foram feitos em quadriplicatas técnicas, sendo três géis

56 Material e métodos

utilizados para transferência e um corado com *Coomassie Brilliant Blue G250*. Os géis foram corados em uma solução de *Coomassie* (0,1% *Coomassie* Brillante Blue G-250 (w/v), 8% sulfato de amônio (w/v), 2% ácido fosfórico (v/v), 20% metanol (v/v)) *overnight*, sendo previamente incubados em solução de fixação (40% etanol (v/v) e 10% ácido acético (v/v)) por 3 h. Depois foram incubados em 0,1M Tris-HCl pH 6,5 por 3 min, em 25% metanol (v/v) por 1 min e em 20% sulfato de amônio (v/v) por 3 min. Posteriormente à coloração, os géis foram digitalizados no *scanner* ImageScanner™ III (GE).

A transferência das proteínas separadas foi realizada por *electroblotting* para a membrana de nitrocelulose de 0,2 µm (Bio-Rad) em um tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol (v/v)) utilizando o sistema de transferência Minitransfer Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) a 350mA por 1 h.

A membrana foi submetida à solução de bloqueio [PBS: 8 mM NaH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,1% de Tween 20 (v/v), pH 7,4; 5% de leite em pó desnatado (w/v)] por 2 h sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, foi incubada na presença de um anticorpo primário anti-Cry1Ab de coelho (Abraxis), diluído 1:1000 em solução de TBS-T (0,1% Tween 20 (v/v), 150 mM NaCl, 50 mM Tris base, pH 7,6) com 2,5% de leite em pó desnatado, por 1,5 a 2 h sob agitação a temperatura ambiente. Depois, incubada na presença de um anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado a HRP de burro (GE Healthcare) diluído 1:150000 em solução de TBS-T com 2,5% de leite em pó desnatado por 1 h sob agitação a temperatura ambiente. Entre cada passo, a membrana foi lavadas 5 vezes por 3 min em tampão TBS-T.

Para revelação utilizou-se o substrato quimioluminiscente Amersham ECL Advance (GE Healthcare) e as imagens foram capturadas em foto-documentador ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad). O foto-documentador realiza a captura de imagens colorimétricas, nas quais pode se

visualizar o marcador molecular na membrana, e imagens quimioluminescentes, que permitem visualizar as bandas imunorreativas. Ambas as imagens podem ser sobrepostas e analisadas densitometricamente no programa Imagem LabTM (Bio-Rad) para poder estimar a concentração da proteína Cry1Ab nos extratos protéicos. Para isso, apenas foram considerados as bandas imunorreativas da Cry1Ab de tamanho molecular ≤ 75 kDa. As concentrações da proteína Cry1Ab obtidas pelos diferentes protocolos foram comparadas mediante a ANOVA, seguida pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

4.4 Caracterização da proteína Cry1Ab

4.4.1 Quantificação da proteína Cry1Ab por DAS-ELISA

O conteúdo da proteína Cry1Ab em dois níveis da folha de milho MON810 foi determinado pelo teste DAS-ELISA (*double antibody sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay*) com o *kit* comercial Qualitative ELISA Bt-Cry1Ab/1Ac (Agdia). Foram amostradas a bainha e a parte média da folha de oito amostras de folhas de milho MON810 no estágio de desenvolvimento V2 (RITCHIE et al., 1992). Para a análise foi usada a segunda folha, considerando como primeira a folha do nível mais baixo. Da parte média da folha foi cortada uma tira de 5 mm e da bainha próxima ao limbo foram cortados 10 mm (Figura 9). As amostras foram armazenadas a -20°C para posteriores análises.

58 Material e métodos

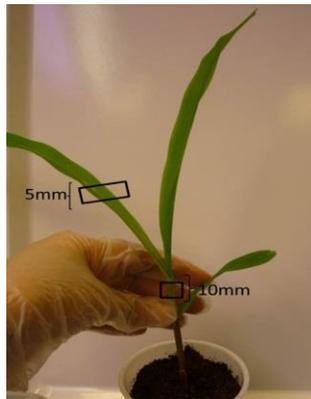


Figura 9. Posição das partes da folha do milho V2 amostradas para a análise de DAS-ELISA (*double antibody sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay*).

As amostras foram colocadas em um microtubo (Protein LoBind Tubes, Eppendorf) com 400mg de *beads* de cerâmica (Matrix D, Bertin Technologies) e tampão PBS-T gelado. Foram maceradas sete vezes a 5m/s por 40 s no FastPrep®-24 (MP Biomedicals) e centrifugadas a 12000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e diluído com tampão PBS-T, até obter uma diluição ao menos 1: 500.

O protocolo foi realizado de acordo com o recomendado pelos fabricantes. Alíquotas de 100 µl dos extratos das amostras, controle negativo, branco (PBS-T) e diferentes concentrações da proteína purificada Cry1Ab ativa (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64ng/ml) foram colocados na placa em triplicata e incubados por 2 h. O conteúdo dos poços foi esvaziado e lavado com tampão PBS-T por sete vezes. Após, foram adicionados 100 µl da solução substrato TMB em cada poço da placa, os quais foram incubados por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, a placa foi lida a 650 nm no espectrofotômetro.

Os modelos de regressão linear, polinomial quadrática e polinomial cúbica foram ajustados aos dados da curva padrão e

para escolher o melhor modelo, esses foram comparados mediante análise de variância (ANOVA). Os parâmetros das equações foram estimados mediante método dos mínimos quadrados. As concentrações da proteína Cry1Ab do limbo e da bainha foram analisadas pelo teste T- Student, ao nível de 5% de significância.

4.4.2 Estimação da massa molecular da proteína Cry1Ab.

Para estimar a massa molecular da proteína Cry1Ab por Western Blot foram usados os doze extratos protéicos obtidos usando os protocolos de Mekawi (2007), Gruber et al. (2011), Pobozy et al. (2013) e Rocca pH 10,6 e as imagens obtidas no passo anterior (4.3) como mostra a Figura 10. As imagens foram analisadas usando o programa Imagem LabTM(Bio-Rad).

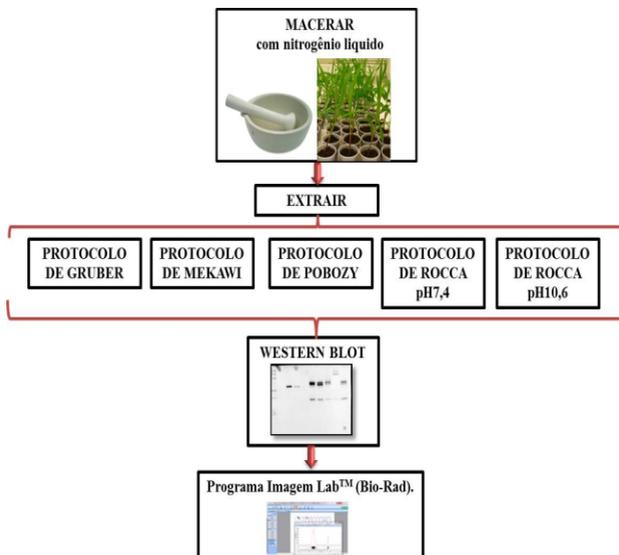


Figura 10. Esquema resumido da metodologia seguida na quantificação de Cry1Ab e estimação da massa molecular da proteína Cry1Ab por Western Blot.

4.4.3 Estimação do ponto isoelétrico da proteína Cry1Ab por Western Blot do gel bidimensional (WB-2D)

As proteínas foram extraídas de seis *pools*: três *pools* de milho MON810 e três *pools* da linha isogênica. Cada *pool* continha amostras de folhas (limbos) de dez plantas. Adicionalmente, foi usada a proteína purificada Cry1Ab ativa (0,3 µg) como controle positivo.

Para a extração foi usado o protocolo de Gruber et al. (2011), como foi descrito anteriormente, e a precipitação das proteínas foi baseada na metodologia de Carpentier et al. (2005).

Também foi testado o protocolo de extração de Carpentier et al. (2005) porque foi observado que os protocolos de extração de proteínas, que usam fenol, têm alto rendimento de proteínas, apresentam boa resolução e intensidade e diminuem a presença de linhas horizontais (*streaks*) no gel (CARPENTIER et al., 2005; SARAVANAN & ROSE, 2004; WU et al., 2014). Isto porque o fenol provoca o movimento das proteínas extraídas da solução aquosa para a fase fenólica, separando os componentes interferentes que permaneceram na fase aquosa (WU et al., 2014).

As proteínas extraídas segundo ambos os protocolos foram precipitadas em quatro volumes de 100 mM acetato de amônio em metanol a -20°C *overnight* e centrifugadas a 15000g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet lavado duas vezes em acetona com 2% DTT (w/v). Entre cada lavagem foi incubado por 30 min a -20°C. O pellet foi secado no concentrador rotativo a vácuo RVC2 -33CD (Christ) e ressuspenso em 400 µL de tampão de lise [7 M uréia, 2 M tiouréia, 30 mM Tris, 4% CHAPS(w/v)] e homogeneizado no *vortex* a temperatura ambiente. As amostras solubilizadas foram quantificadas utilizando-se 2D-Quant Kit (GE Healthcare).

A eletroforese bidimensional foi realizada conforme as indicações propostas pelos fabricantes dos equipamentos do

laboratório (GE Healthcare e Bio-Rad). Na focalização isoelétrica (IEF) foram usadas tiras desidratadas de 7 cm com gradiente linear pH 4-7 (Bio-Rad). As tiras foram reidratadas com 125 µl de solução de reidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% CHAPS (w/v), 0,5% IPG Buffer (v/v), 0,002% azul de bromofenol (w/v), 0,28% DTT (w/v)) contendo 200 µg de proteínas totais dentro de *Immobiline™ DryStrip Reswelling Tray* (GE, Healthcare) *overnight* a 20°C.

As tiras reidratadas foram submetidas à focalização isoelétrica em equipamento *Ettan™ IPGphor™ 3* (GE Healthcare) a 20°C, usando o seguinte programação: 300 V a 0,9 kVh , 1.000 V a 0,3 kVh (grad), 5000 V a 4,5 kVh (grad) e 5.000 V a 3 kVh e um passo final de 100V a 2 kVh, totalizando 8900 Vh de corrida. As tiras foram reduzidas por 15 min, sob leve agitação, em 4 mL de solução de equilíbrio[(75 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 29,3% glicerol (v/v),2% SDS (w/w), 0,002% azul de bromofenol (w/v)] contendo 1% (w/v) de DTT e em seguida, nas mesmas condições, foram alquiladas em solução de equilíbrio contendo 2,5% iodoacetamida (w/v).

A segunda dimensão, foi realizada no MINI PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) com gel de poliacrilamida 12% [0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 12% acrilamida (w/v), 0,4% bisacrilamida (w/v), 0,1% SDS (w/v), 0,05% persulfato de amônio (w/v) e 0,05% Temed (v/v)], 1,5 mm de espessura a 15mA/gel por 15min e 30mA/gel por 60 min. Utilizou-se um marcador de massa molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad).

As proteínas do gel bidimensional foram transferidas por *electroblotting* para membrana de nitrocelulosa. Os passos do *blotting* foram realizados do mesmo modo que o descrito anteriormente (seção 4.3.2).

As imagens foram capturadas no foto-documentador ChemiDoc™ MP System (Bio-rad). Para estimar o ponto

62 Material e métodos

isoeletrico da proteína Cry1Ab foi usado o programa Image Master 2-D Platinum (GE Healthcare).

4.4.4 Análise da proteína Cry1Ab por Espectrometria de massa.

Os spots da proteína Cry1Ab foram retirados e enviados para Plataforma Proteômica da Universidade de Tromsø (Noruega) para o processamento e análise. Os spot gel foram submetidos a redução, alquilação e digestão com tripsina usando 6 ng/ μ l (Promega) (SHEVCHENKO et al., 1996). A mistura de peptídeos contendo 0.1% de ácido fórmico foi carregada no sistema EASY-nLC1000 (Thermo Fisher Scientific) e EASY-Spray column (C18, 2 μ m, 100 Å, 50 μ m, 15 cm). Os peptídeos foram fracionados usando 2-100% gradiente de acetonitrila em 0,1% ácido fórmico com um fluxo de 250 nl/min. Os peptídeos separados foram analisados usando o Thermo Scientific Q-Exactive mass spectrometer. Os dados foram processados no programa Proteome Discoverer 1.4. Os espectros de fragmentação foram procurados no banco de dados NCBIr usando o programa Mascot (Matrix Sciences, UK). Os parâmetros utilizados na busca no banco de dados foram os seguintes: Taxonomia: Green plant ou Firmicutes; enzima: tripsina; tolerância das massas dos peptídeos: 10ppm e tolerância massa fragmento: 0,02 Da. Os íons peptídeos foram filtrados usando *False Discovery Rate* de 1% para identificação das proteínas.

4.5 Detecção das proteínas que interagem com a proteína Cry1Ab

4.5.1 Ensaio de imunoprecipitação da proteína Cry1Ab com possíveis parceiros de interação

4.5.1.1 Extração de proteínas totais (não-denaturante)

A extração de proteínas foi realizada usando a metodologia de Mekawi (2009) com algumas modificações. O tampão de extração não continha EDTA, nem DTT e foi usado 1 mM PMSF ao invés de *cocktail* de inibidor de protease. As proteínas foram extraídas em agitação constante em um radio de 1:5 (peso: volume) nos tampões de extração. Para a extração foram usados três *pools* de milho MON810 e três do milho isogênico, cada pool com folhas de 10 plantas (5 g). Com o objetivo de conferir a presença ou ausência da proteína Cry1Ab nos extratos protéicos foi realizado um teste através das tiras de fluxo lateral *QuickStixAS003* CRLS (EnviroLogix). A proteína Cry1Ab foi quantificada nos extratos protéicos por meio do teste de DAS-ELISA.

Previamente à extração, foi realizado um teste piloto para saber se o rendimento do protocolo tinha sido modificado pela eliminação do DTT e EDTA do tampão de extração. Além disso, foi testado o mesmo tampão (50 mM CAPS, 100 mM NaCl e 1 mM PMSF a pH 10,8) com 0,5% Triton X-100. Os extratos protéicos foram analisados por Western Blot segundo a metodologia descrita na seção 4.3.2.

4.5.1.2 Imunoprecipitação da proteína Cry1Ab com possíveis parceiros de interação

Para a imunoprecipitação foram usadas as beads magnéticas Pureproteome Proteins G (Merck Millipore) e foi seguida a metodologia recomendada pelo fabricante com alguns

64 Material e métodos

ajustes através de testes pilotos. A metodologia usada para os testes pilotos foi a seguinte. Em um microtubo de 1,5 ml foi colocado 1 ml do extrato protéico ou 8 µg de proteína purificada Cry1Ab ativa e 3µg do anticorpo foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente (TA) em agitação constante. Após incubação, foi colocado 7 µl da suspensão de beads magnéticas, previamente lavadas com PBS-T (0,1% Tween-20), e incubados por 30 min a TA em agitação. Depois, o tubo foi colocado no rack magnético, o extrato foi removido e as beads foram lavadas 3 vezes com 500 µl PBS-T. Após a última lavagem, foram colocados 60 µl de tampão de eluição (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS (w/v), 10% glicerol (v/v), 50 mM DTT) e incubado por 10 min a 85°C. O microtubo foi colocado no rack e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram analisadas por SDS-PAGE (12%) e alguns casos foram analisados por meio de Western Blot. O Western Blot foi realizado de acordo com a metodologia descrita nas seções anteriores (4.3.3), mas foi usada a Proteína G conjugada a peroxidase (Sigma) na diluição de 1:10000, como anticorpo secundário.

Tipo de anticorpo: Inicialmente foram testados dois anticorpos policlonais de coelho: anti-Cry1Ab (Abraxis) e anti-Cry1Ab/Ac (Abraxis), com o objetivo de saber qual dos dois anticorpos tem maior afinidade à proteína Cry1Ab. Foram usados extratos protéicos de milho transgênico e isogênico no teste e as amostras imunoprecipitadas foram analisadas por Western Blot.

Tempo de incubação e temperatura: O tempo de incubação do extrato protéico de milho transgênico com o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab (Abraxis) variou entre uma, duas e três horas, com duas temperaturas de incubação (temperatura ambiente e em gelo). As amostras imunoprecipitadas foram analisadas por Western Blot. Para testar se o tempo de incubação maior do que 3 h favorece a formação do complexo Cry1Ab-anticorpo, foi incubada a proteína Cry1Ab ativa com o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab por 3, 4, 5, 6 e 7 h em gelo. Para poder diferenciar o

anticorpo imunoprecitado da proteína Cry1Ab, foi incubado o anticorpo sem colocar proteína Cry1Ab para poder obter só anticorpo imunoprecitado. As amostras imunoprecitadas foram analisadas em gel SDS-PAGE.

Solução de incubação a diferentes pH: Foi testada a incubação da proteína Cry1Ab ativa com o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab em soluções de 1M Tris a diferentes pH 6,8, 7,4, 10, 8,8, 11,0 e em água com o fim de saber se o pH influi na ligação de Cry1Ab e o anticorpo. As amostras imunoprecitadas foram analisadas em gel SDS-PAGE.

Número de lavagens das beads: Foi testado o número de lavagens das *beads* de 3 a 6 vezes usando PBS-T (0,1% tween-20) para diminuir as “proteínas contaminantes”, ou seja, as proteínas que se ligam inespecificamente ao anticorpo e as *beads* magnéticas. As amostras imunoprecitadas foram analisadas em gel SDS-PAGE.

Tipo de solução de lavagem: Foram testados três tipos de soluções para lavar as *beads*. As soluções testadas foram PBS-T, PBS com 1% Triton X-100 e PBS com 0.5M NaCl. As amostras imunoprecitadas foram analisadas em gel SDS-PAGE.

Eluição: Para otimizar a eluição do anticorpo das *beads* foi usado o tampão de eluição com 50 mM DTT, 4,76% mercaptoetanol e sem agente redutor, com o objetivo de recuperar a maior quantidade de proteína. Os fabricantes recomendam repetir o passo de eluição quando se trabalha com baixas concentrações da proteína alvo, como a proteína Cry1Ab. Por isso, eluímos duas vezes o anticorpo das *beads* usando 15 µl de tampão de eluição, totalizando um volume de 30 µl, e eluímos uma vez em 30 µl de tampão de eluição.

Para o ensaio final de imunoprecipitação foram utilizados 25 ml de extrato protéico (~22,5 mg proteínas totais) de cada uma das amostras de milho transgênicas (3) e isogênicas (3). As quantidades de anticorpo e das *beads* magnéticas usadas por 1 ml

66 Material e métodos

de extrato protéico (~900 µg) foram iguais às utilizadas nos testes pilotos, 3 µg e 7 µl, respectivamente. A Figura 11 mostra de forma resumida os passos seguidos antes e após o ensaio de imunoprecipitação.

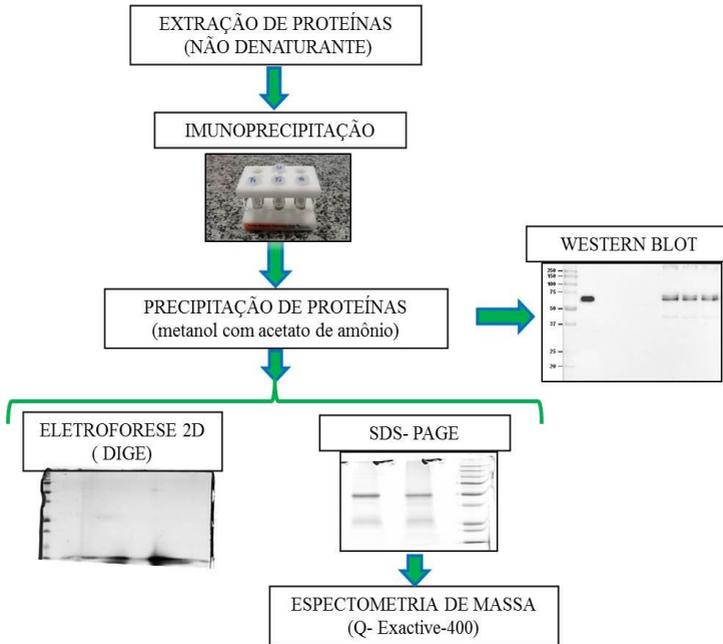


Figura 11. Esquema resumido da metodologia seguida antes e após o ensaio de imunoprecipitação

4.5.1.3 Precipitação das proteínas imunoprecipitadas

As proteínas imunoprecipitadas de 25 ml de extrato protéico foram precipitadas de acordo com o método descrito por Carpentier et al. (2005). O pellet obtido foi secado em concentrador rotativo a vácuo (Christ RVC2 -33CD) por 15 min e solubilizado em 50 µl de tampão de lise [7 M uréia, 2 M tiouréia, 30 mM Tris, 4% CHAPS(w/v)]. Foi realizada a precipitação de proteínas das amostras imunoprecipitadas porque o tampão de

elução não era compatível com a técnica de coloração por fluorescência conhecida como *2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis* – DIGE.

4.5.1.4 Western Blot das proteínas imunoprecipitadas

Para validar os resultados da imunoprecipitação foi verificada a presença da proteína Cry1Ab em 5 µl de proteínas imunoprecipitadas e precipitadas de milho transgênico e isogênico solubilizadas em tampão uréia/tioureia (5 µl) mediante a técnica de Western Blot. A proteína purificada Cry1Ab ativa foi usada como controle positivo. O protocolo de Western Blot foi o mesmo descrito nas seções anteriores, mas desta vez foi usado outro anticorpo primário, anticorpo monoclonal anti-Cry1Ab de rato (Abcam) na diluição de 1:1000 e como anticorpo secundário anti-rato IgG conjugado a HRP de ovelha (Millipore) na diluição de 1:10000.

4.5.1.5 Eletroforese bidimensional (2-DE) das proteínas imunoprecipitadas

Para detectar as proteínas que interagem com a proteína Cry1Ab, as proteínas imunoprecipitadas e solubilizadas foram previamente marcadas com Amersham *CyDye DIGE fluors minimal dye* (GE Healthcare) antes da eletroforese bidimensional. Foi utilizado o sistema de marcação com três marcadores fluorescentes (Cy2, Cy3 e Cy5). Os marcadores CyDye foram reconstituídos em DMF (dimetilformamida). O padrão interno foi marcado com Cy2 e as amostras foram marcadas com Cy3 e Cy5. O padrão interno foi um pool das seis amostras imunoprecipitadas de milho transgênico e isogênico, e para isso foram utilizados 12 µl de cada amostra. Na marcação foram usados 24 µl de proteínas imunoprecipitadas e precipitadas de milho transgênico e isogênico com 80 pmol CyDye DIGE fluors. As proteínas foram marcadas de acordo com o descrito na Tabela 4 e foram deixadas em gelo por 30 min no escuro. Logo, foi

68 Material e métodos

adicionado 1µl de 10 mM lisina e deixado por 10 min no escuro. Após a marcação das amostras (Cy3 e Cy5) e do padrão interno (Cy2), estes foram misturados e foi adicionado igual volume de tampão [7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% CHAPS, 1% IPG Buffer, pH 3-10 (v/v), 0,2% DTT (w/v)] e deixado no gelo por 15 min.

Tabela 4. Composição das misturas das proteínas imunoprecipitadas marcadas com fluoróforos utilizados na análise proteômica.

Cy2	Cy3	Cy5
Padrão interno	Amostra IP de milho transgênico 1	Amostra IP de milho isogênico 1
Padrão interno	Amostra IP de milho isogênico 2	Amostra IP de milho transgênico 2
Padrão interno	Amostra IP de milho isogênico 3	Amostra IP de milho transgênico 3

IP: imunoprecipitadas.

Após a marcação das proteínas foi realizada a rehidratação das tiras de gel com gradiente de pH imobilizado (*Immobiline™ DryStrip* GE) pH 3-10. Para a focalização foi usada a seguinte programação: 300 V a 0,9 kWh, 1.000 V a 0,3 kWh (grad), 5000 V a 4 kWh (grad) e 5.000 V a 2 kWh e um passo final de 100 V a 0,1 kWh, totalizando 7200 Vh de corrida. Após a focalização isoeletrica as tiras foram reduzidas por 15 min, sob leve agitação, em 4 mL de solução de equilíbrio (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 29,3% glicerol (v/v), 2% SDS (w/w), 0,002% azul de bromofenol (w/v)) contendo 0,5% DTT (w/v) e em seguida, nas mesmas condições, foram alquiladas em solução de equilíbrio contendo 4,5% iodoacetamida (w/v).

A metodologia seguida para a segunda dimensão foi a mesma descrita na seção 4.4.3. Os géis foram digitalizados no equipamento FLA-9000 (Fujifilm Lifescience, Dusseldorf, Alemanha). As imagens foram analisadas com ajuda do programa Image Master 2-D Platinum 7.0 DIGE de acordo com o manual do fabricante. A detecção dos *spots* foi realizada pelo programa e somente aqueles que foram reproduzidos nas três replicatas

biológicas foram incluídos nas análises. Os *spots* presentes em ambas as amostras (milho MON810 e isogênico) significaria que seriam proteínas “contaminantes” que unem aos *beads* ou ao anticorpo e não estão interagindo com a proteína Cry1Ab.

4.5.1.6 SDS-PAGE de proteínas imunoprecipitadas

As três amostras protéicas imunoprecipitadas e precipitadas de milho transgênico foram misturadas e carregadas no gel SDS-PAGE (12%) com o fim de retirar os agentes interferentes para a análise por Espectrometria de massa. Procedeu-se da mesma maneira com as amostras imunoprecipitadas de milho isogênico, carregadas também no gel. Essa foi usada como controle, já que muitas das possíveis proteínas identificadas na mistura de imunoprecipitados de milho transgênico foram “contaminantes” e não foram possíveis proteínas parceiras de Cry1Ab. A separação das proteínas no gel foi realizada até que as proteínas percorressem 1,5 cm no gel. Após a corrida, o gel foi corado com azul de *coomassie* do acordo a metodologia explicada na seção 4.3.2. As duas canaletas das proteínas imunoprecipitadas no gel foram cortadas em quatro pedaços, retirando a banda do anticorpo policlonal anti-Cry1Ab, e enviadas para a análise por Espectrometria de massa.

4.5.1.7 Identificação das proteínas imunoprecipitadas por Espectrometria de massa

As bandas de gel foram enviadas para a Plataforma Proteômica da Universidade de Tromsø (Noruega) para seu processamento e análise. A metodologia seguida foi descrita na seção 4.3.6. Para esta análise foram consideradas as proteínas identificadas com uma cobertura da sequência de peptídeos no mínimo de 20%.

70 Material e métodos

4.5.2 Ensaio de Ligand Blot de proteínas de milho com a proteína Cry1Ab

4.5.2.1 Extração de proteínas de milho

Proteínas foram extraídas de folhas de 6 plantas de milho MON810 e isogênico de acordo com os protocolos de Mekawi (2009) e de Rocca em pH10,6, obtendo-se quatro extratos proteicos, os quais foram armazenados imediatamente a -20°C. A quantificação das proteínas totais das quatro amostras protéicas foi realizada com 2-Quant Kit (GE) e foi verificada a presença da proteína Cry1Ab nas amostras protéicas com ajuda das tiras AgraStrip®CRY1Ab Seed&Leaf (Romers Lab).

4.5.2.2 Ensaio de Ligand Blot

As proteínas de milho transgênico e isogênico (10 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida a 10% NuPAGE Bis-Tris (Life Technologies). Previamente as amostras foram misturadas com 7 µl de tampão de amostra NuPAGE LDS (pH 6,8), 2 µl de DTT 1M e completadas com água Milli-Q para 20 µl. As amostras preparadas foram aquecidas por 5 min a 95°C e carregadas no gel. A corrida foi realizada no sistema XCell SureLock™ Mini-Cell (Life Technologies) a 200V por 70 min. O gel foi feito em duplicata para que um fosse corado com azul de *coomassie* eo outro fosse usado para a transferência.

As proteínas separadas foram transferidas por *electroblotting* a membrana de PVDF (Merck Millipore) no tampão de transferência NuPAGE (Life) com 20% metanol (v/v) a 30 V por 80 min.

A membrana foi bloqueada em PBS com 0,05% Tween-20 (v/v) e 5% de leite desnatado em pó (w/v) por duas horas sob agitação constante a TA. A membrana bloqueada foi incubada sem e com 10µg/ml de proteína purificada Cry1Ab ativa em PBS-T com 2,5% de leite desnatado em pó. Para a detecção das

possíveis ligações da proteína Cry1Ab com proteínas de milho, foi incubada a membrana com o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab de coelho (Abraxis) diluído 1:800 em PBS-T com 2,5% de leite desnatado em pó por 80 minutos a TA. Em seguida, foi incubada em anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado a HRP de burro (GE Healthcare) diluído 1:12000 em solução de PBS-T com 2,5% de leite em pó desnatado por 1 h sob agitação a temperatura ambiente. Entre cada passo, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min em tampão TBS-T (0,05% tween 20 (v/v), 150 mM NaCl, 50 mM Tris base, pH 7,6).

Para revelação foi utilizado o substrato quimioluminescente SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) e as imagens capturadas em leitor ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). A metodologia seguida antes, durante e depois do ensaio de Ligand Blot foi mostrada de maneira resumida na Figura 12.

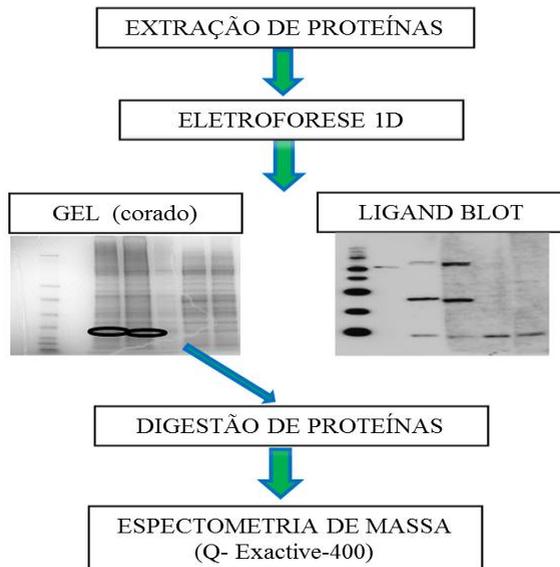


Figura 12. Esquema resumido da metodologia seguida antes, durante e após o ensaio de Ligand Blot.

4.5.2.3 Identificação das possíveis proteínas que se ligam à proteína Cry1Ab

As bandas imunorreativas detectadas no Ligand Blot de proteínas de milho com Cry1Ab foram cortadas do gel corado com azul de coomassie. Também foram cortadas as bandas das amostras nas quais não foi detectada a banda imunorreativa. Para localizar a posição da banda no gel foi sobreposta a imagem do Ligand Blot no gel corado. O marcador molecular também facilitou na localização da banda no gel. As bandas de gel também foram enviadas para a análise por Espectrometria de massa. O procedimento seguido para ambos os casos foi o mesmo descrito na secção 4.3.6.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção do promotor 35S e do gene *cry1Ab* em milho MON810

O teste da PCR para o gene da zeína foi positivo nos seis grupos de plantas, tanto no milho MON810 e quanto na linha isogênica (Figura 13). Os três grupos de plantas de milho MON810 foram positivos para os transgenes (P35S e *cry1Ab*) enquanto os outros três grupos de milhos isogênicos foram negativos para ambos os transgenes. Na reação onde foi colocada água ao invés do DNA, não foi observada a presença de algum amplicon. Os resultados da PCR confirmaram que o material usado era milho MON810 e que a linha isogênica não tinha sido contaminada com material transgênico.

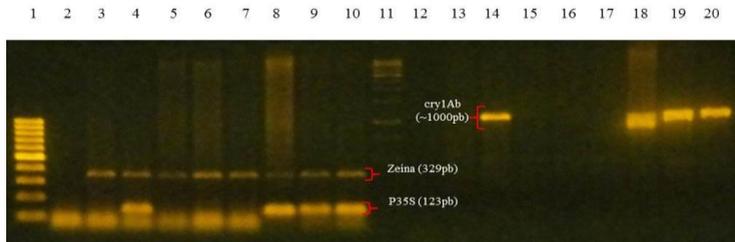


Figura 13. Fragmentos amplificados do gene da zeína (329pb), promotor 35S (123 pb) e gene *cry1Ab* (~1000pb). Linha 1: Marcador molecular de 1000 pb. Linha 2: Água. Linha 3: Controle negativo, DNA de milho isogênico. Linha 4: Controle positivo, DNA de milho MON810. Linhas 5-7: DNA dos três pools gênicos do milho isogênico. Linhas 8-10: DNA dos três pools gênicos do milho MON810. Linha 11: Marcador molecular de 10000 pb. Linha 12: Água. Linha 13: Controle negativo, DNA de milho isogênico. Linha 14: Controle positivo, DNA de milho MON810. Linhas 15-17: DNA dos três pools gênicos do milho isogênico. Linhas 18-20: DNA dos três pools gênicos do milho MON810.

74 Resultados

5.2 Caracterização da proteína Cry1Ab

5.2.1 Quantificação da proteína Cry1Ab por DAS-ELISA

Os dados obtidos da quantificação da proteína Cry1Ab no milho MON810 se ajustaram à curva de regressão quadrática e cúbica ao nível de significância de 5%, sendo os valores dos coeficientes de determinação ajustados (R^2 : 0,99 e 0,97). Porém, quando ambos os modelos foram comparados usando uma ANOVA não foi observada diferença significativa entre os modelos ($p > 0,05$). No entanto, o modelo quadrático foi o modelo com maior acurácia (Figura 1 do Apêndice).

O conteúdo da proteína Cry1Ab observado no limbo foi diferente do observado na bainha (t-student: $p < 0,05$), sendo aquele seis vezes maior do que o observado na bainha (Figura 14). No limbo o conteúdo médio da proteína Cry1Ab foi de $55,56 \pm 6,54 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, com um coeficiente de variação (CV%) igual a 11,8, e na bainha foi de $10,29 \pm 2,42 \mu\text{g/g}$ massa fresca com CV% igual a 23,5. Os conteúdos de Cry1Ab detectados nos limbos variaram entre 42,4 a 63,75 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e nas bainhas variaram entre 4,85 – 12,35 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca. Mediante o teste de Grubb, nos dados dos conteúdos da proteína na bainha foi encontrado um *outlier* (4,85 $\mu\text{g Cry1Ab/g}$ massa fresca, $p < 0,05$), mas esse valor não foi desconsiderado porque a variação na expressão de proteína Cry1Ab é comum em milho MON810, e por isso não poderia ser um erro de medição.

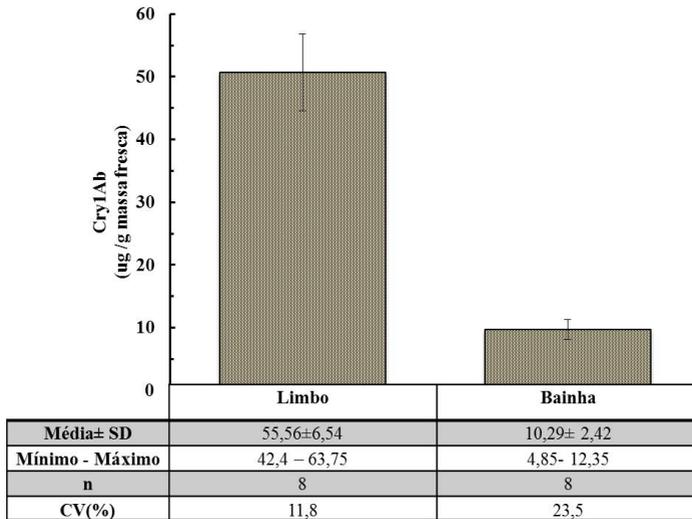


Figura 14. Conteúdo médio da proteína Cry1Ab no limbo e na bainha de milho MON810 no estágio de desenvolvimento V2. SD: desvio padrão. n: número de plantas. CV(%): porcentaje de coeficiente de variação.

5.2.2 Caracterização da proteína Cry1ab por Western Blot

Não foi observada nenhuma banda da proteína Cry1Ab na análise de Western Blot do extrato protéico de milho isogênico usado como controle negativo. Uma banda imunorreativa de aproximadamente 60 kDa foi encontrada no controle positivo que corresponde à proteína purificada Cry1Ab ativa produzida em *E. coli*. Nos extratos protéicos de milho MON810 detectou-se a banda imunorreativa de aproximadamente 70 kDa que corresponde ao núcleo ativo da proteína Cry1Ab truncada. No entanto também foi detectada outra banda imunorreativa de menor massa molecular (65 kDa) nos extratos protéicos (Figura 15). Além das duas primeiras bandas imunorreativas de 70 kDa e 65 kDa, foram encontradas outras duas bandas de

76 Resultados

aproximadamente 39 kDa e 34 kDa nos extratos protéicos de milho MON810 analisados.

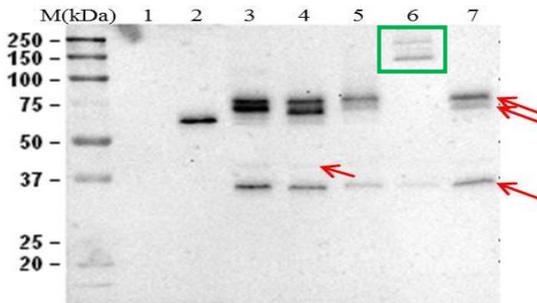


Figura 15. Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab (70 kDa, 65 kDa, 39 kDa e 34 kDa) nos extratos protéicos de milho MON810 obtidos com diferentes protocolos de extração. M: Marcador de massa molecular (kDa). Linha 1: Extrato de milho isogênico, controle negativo. Linha 2: Proteína purificada Cry1b ativa, controle positivo. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7: Extratos protéicos obtidos usando o protocolo de Gruber, Mekawi, Pobozy, Rocca pH7,4 e Rocca pH 10,6, respectivamente. As setas vermelhas indicam as quatro bandas imunorreativas correspondentes à proteína Cry1Ab. O quadro verde indica as bandas imunoreativas maiores a 70kDa.

Em total foram encontradas quatro bandas imunorreativas, de 70 kDa, 65 Kda, 39 kDa e 34 kDa, correspondentes a proteína Cry1AbA nos extratos proteicos (Tabela 5).

Tabela 5. Estimação da massa molecular da proteína Cry1Ab em milho MON810 por Western Blot.

Massa molecular (kDa)	
Cry1Ab	70,4±1,2
	64,8±1,7
	39,3±1,1
	33,8±0,9

Na análise não foram usados os extratos protéicos obtidos com o protocolo de Rocca pH 7,4 devido ao fato de que

não foi detectada nenhuma das bandas correspondentes a núcleo ativo (70kDa e 65kDa). Não obstante as bandas imunorreativas de 39 kDa e 34 kDa foram detectadas nos extratos proteicos. Além das bandas mencionadas, foram encontradas nesses extratos outras bandas imunorreativas de massa molecular maior a 70 kDa, entre 120 kDa e 180 kDa (Figura 15, retângulo verde).

5.2.3 Ponto isoelétrico da proteína Cry1Ab

As proteínas extraídas de milho MON810 segundo o protocolo de extração de Gruber et al. (2011) foram analisadas mediante Western Blot 2D para detectar a proteína Cry1Ab e estimar o ponto isoelétrico. A análise de Western Blot 2D das amostras protéicas de milhos isogênicos, usadas como controle negativo, não evidenciou nenhum spot imunorreativo (Figura 16D). No Western Blot 2D do controle positivo (proteína purificada Cry1Ab ativa) esperava-se a presença de um spot imunorreativo correspondente à Cry1Ab. Em vez disso foi observada uma linha horizontal (*streaks*) de aproximadamente 60 kDa com um *spot* pouco definido de ponto isoelétrico (PI) igual a 4,9 (Figura 16C).

Nos Western Blot 2D das três amostras transgênicas também foi observado a presença de linhas horizontais de diferentes massas moleculares. A primeira de massa molecular de ~70 kDa, a segunda de ~65 kDa, a terceira de ~39 kDa e a quarta de ~34 kDa. A terceira tinha menor intensidade em comparação às outras, e a de 65 kDa só foi observada em algumas amostras. No âmbito da “linha” de 70 kDa foram observados quatro *spots* pouco definidos com diferentes PI, um *spot* de PI 4,2 e os outros três *spots* que variaram de 4,9 a 5,3. Na linha de 34 kDa foram encontrados dois *spots* pouco definidos, variando de PI 4,9 a 5,3 (Figura 16A).

78 Resultados

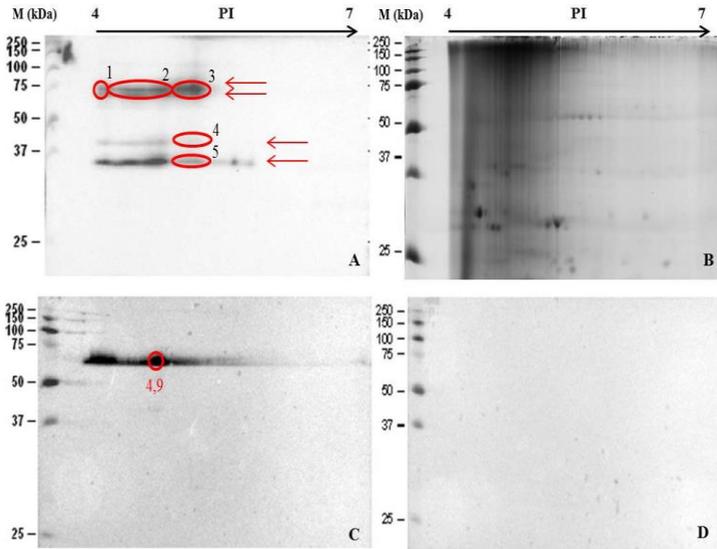


Figura 16. Western Blot 2D da proteína Cry1Ab na amostra protéica de milho MON810 (A), de milho isogênico (D) e da proteína purificada Cry1Ab ativa (C). Gel bidimensional de amostra protéica de milho MON810 corado com azul de coomassie (B). As amostras foram extraídas segundo o protocolo de Gruber et al. (2001).

As linhas foram cortadas e analisadas por Espectrometria de massa, as de 70 kDa e 34 kDa foram cortadas em três partes do PI de 4,0 a 4,2, 4,2 a 4,9 e 4,9 a 5,3, e a de 39 kDa foi cortada de igual modo, sem incluir a parte do meio (PI 4,2 a 4,9) porque no Western Blot 2D o sinal foi fraco.

A análise de Espectrometria de massa mostrou que a proteína Cry1Ab estava presente nas linhas de 70 kDa, 39 kDa e 34 kDa na faixa de PI de 4,9 a 5,3 e na linha de 70 kDa de PI 4,0 a 4,2 (Figura 16 A, Tabela 6).

Tabela 6. Proteína Cry identificada nos *spots* do gel bidimensional de amostras de milho MON810 (Figura 16A).

Número	Nº de acesso	Espécie	Nome da proteína	Mascot score	% Cobertura	Nº peptídeos	MM teórico (kDa)	PI teórico
1	169930479	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated Cry1Ab	60.65	1.95	1	69.3	6.40
2	208155		Cry1A(a), partial [synthetic construct]	80.30	3.58	2	68.9	6.27
3	169930479	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated Cry1Ab	155.51	11.29	6	69.3	6.40
4	169930479	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated Cry1Ab	102.09	5.16	2	69.3	6.40
5	169930479	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated Cry1Ab	87.74	6.13	3	69.3	6.40

80 Resultados

As amostras protéicas de milho MON810 extraídas segundo o protocolo de Carpentier et al. (2005) foram analisadas por Western Blot 2D e a proteína Cry1Ab não foi detetada nas amostras de milho MON810 analisadas.

5.3 Comparação de protocolos de extração da proteína Cry1Ab por Western Blot/densitometria

Os rendimentos de extração de proteínas totais dos cinco protocolos foram significativamente diferentes, segundo a ANOVA ($p < 0,05$). De acordo com as análises Post-ANOVA (Tukey), o maior rendimento de extração de proteínas totais de folhas de milho MON810 foi obtido utilizando o protocolo de Rocca pH 10,6 ($10,3 \pm 0,98$ mg.g⁻¹ massa fresca) seguido do protocolo de Gruber et al. (2011) ($7,85 \pm 0,08$ mg.g⁻¹ massa fresca), Mekawi (2009) ($6,7 \pm 0,86$ mg.g⁻¹ massa fresca) e Rocca pH 7,4 ($5,82 \pm 0,85$ mg.g⁻¹ massa fresca). O menor rendimento foi obtido quando foi utilizado o protocolo de Pobozy et al. (2013) ($5,61 \pm 0,98$ mg.g⁻¹ massa fresca) (Figura 17).

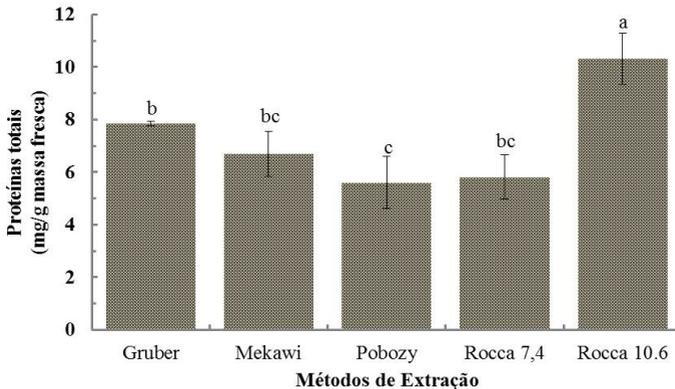


Figura 17. Rendimento médio de extração de proteínas totais (mg.g⁻¹ massa fresca) de folhas de milho MON810 de cinco protocolos de extração. As diferentes letras nas barras indicam que existe diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=3$).

Na quantificação de Cry1Ab nos extratos proteicos foram considerados os quatro tamanhos da proteína reportados (70 kDa, 65 kDa, 39 kDa e 34 kDa) na seção 5.2.2, quando elas estavam presentes (Figura 18).

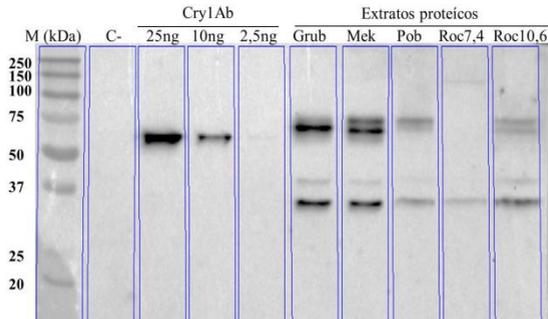


Figura 18. Western Blot mostrando as proteína Cry1Ab de 70 kDa, 65 Kda, 39 Kda e 34 kDa, nos extratos protéicos de milho MON810 obtidos usando cinco diferentes protocolos de extração: Gruber (Grub), Mekawi (Mek), Pobozy (Pob), Rocca pH7,4 (Roc7,4) e Rocca pH 10,6 (Roc 10,6). M: marcador de massa molecular conhecida (kDa). C-: extrato proteico de milho isogênico, controle negativo. Cry1Ab: proteína purificada Cry1Ab ativa em diferentes concentrações.

Os protocolos que produziram maior rendimento da extração da proteína Cry1Ab foram os protocolos de Mekawi (2009) e Gruber et al. (2011) com $42,76 \pm 2,34 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e $41,71 \pm 316 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. O rendimento de ambos os protocolos não foi significativamente diferente ($p > 0,05$) mediante a ANOVA.

Os protocolos que seguiram em rendimento foram os protocolos de Rocca pH 10,6 com $21,96 \pm 2,79 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e Pobozy et al. (2013) com $19,72 \pm 1,42 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca. E o protocolo a partir do qual se obteve menor rendimento de Cry1Ab foi o de Rocca pH 7,4 ($7,37 \pm 4,57 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca).

82 Resultados

Os rendimentos foram significativamente diferentes segundo a ANOVA ($p < 0,05$) e foram separados em três grupos mediante o teste de Tukey (Figura 19). No primeiro grupo estão os rendimentos obtidos usando os protocolos de Mekawi (2009) e Gruber et al. (2011) e no segundo grupo, os rendimentos dos protocolos de Rocca pH 10,6 e Pobozy et al. (2013), e o rendimento da extração da proteína Cry1Ab usando o protocolo de Rocca pH 7,4 foi significativamente menor do que os outros.

Segundo os resultados de quantificação de proteínas totais e da proteína Cry1Ab nas amostras, a quantidade de proteína total não serve como indicador da quantidade de proteína Cry1Ab extraída.

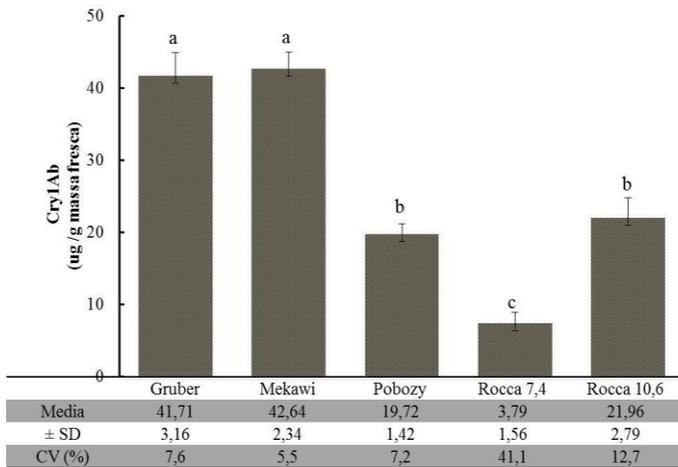


Figura 19. Rendimento médio da extração da proteína Cry1Ab ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca) de folhas de milho MON810 de cinco protocolos de extração. As diferentes letras nas barras representam diferença estatística, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=3$). SD: Desvio padrão. CV: coeficiente de variação.

5.4 Detecção de possíveis proteínas que interagem com a proteína Cry1Ab

5.4.1 Ensaio de Imunoprecipitação da proteína Cry1Ab com possíveis parceiros de interação

A eliminação de EDTA e DTT do tampão de extração quase não alterou o rendimento de extração do protocolo, já que as intensidades das bandas foram parecidas. O uso de Triton X-100 no tampão de extração não favoreceu a extração porque nenhuma banda foi detectada no extrato protéico, do mesmo modo no extrato protéico de milho isogênico, no qual nenhuma banda imunorreativa foi encontrada (Figura 20).

Portanto, o protocolo de Mekawi (2009) modificado foi usado para extrair as proteínas totais de milho para o ensaio de imunoprecipitação.

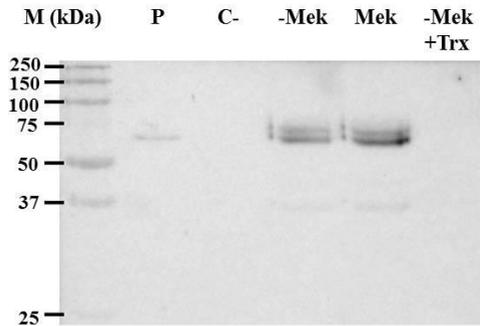


Figura 20. Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab nos extratos protéicos de milho MON810 obtidos usando protocolo de Mekawi (2009) modificado (-Mek), original (Mek) e modificado com adição de Triton X-100 (-Mek+Trx). M: Marcador de Massa Molecular (kDa). P: Proteína Cry1Ab ativa. C-: Extrato protéico de milho isogênico, controle negativo.

O teste com as tiras de fluxo lateral mostrou que a toxina Cry1Ab estava ausente nas amostras protéicas de milho isogênico e presente nas amostras transgênicas, como era esperado (Figura

84 Resultados

2 do Apêndice). Após confirmar a presença da proteína Cry1Ab nos extratos, procedeu-se à quantificação por ELISA. Os três extratos protéicos de milho MON810 apresentaram concentrações parecidas de Cry1Ab, 2,15, 1,85 e 2,35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca.

Ao comparar a afinidade dos dois tipos de anticorpos foi observado que o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab tem maior afinidade com a proteína Cry1Ab do que o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab/Ac. Pode-se observar na Figura 21 que a intensidade da banda foi maior quando o extrato foi incubado com o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab. As bandas imunorreativas que apareceram no Western Blot correspondem ao anticorpo (Figura 21, seta verde) e a proteína Cry1Ab (Figura 21, seta vermelha) que eluíram juntas na imunoprecipitação. Isto se deve ao fato de que a Proteína G conjugada a peroxidase usada no Western Blot, reconhece o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab. É por isso que nas amostras imunoprecipitadas de milho MON810 foram observadas as bandas imunorreativas do anticorpo de ~50 kDa (Figura 21, seta verde) e da proteína Cry1Ab de ~70 kDa e 39 kDa (Figura 21, seta vermelha) que estava ligada ao anticorpo, diferente das amostras de milho isogênico, nas quais foi observado somente o anticorpo (Figura 21, seta verde).

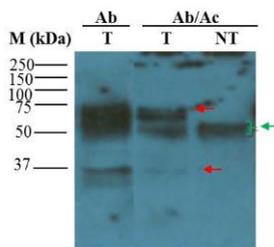


Figura 21. Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab nas amostras imunoprecipitadas de milho MON810 (T) e do milho isogênico (NT). As amostras foram incubadas com anticorpo policlonal anti-Cry1Ab/Ac (Ab/Ac) e anticorpo policlonal anti-Cry1Ab (Ab) por 2 h e imunoprecipitadas usando as *beads* magnéticas. M: marcador de massa molecular (kDa). Seta verde indica o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab e a seta vermelha, a proteína Cry1Ab.

A incubação do anticorpo e o extrato protéico realizada com gelo foi menos efetiva, pois foi recuperada uma menor quantidade da proteína Cry1Ab do que a incubação realizada a temperatura ambiente (Figura 22). Mas para integridade das amostras, as incubações do ensaio foram realizadas em gelo.

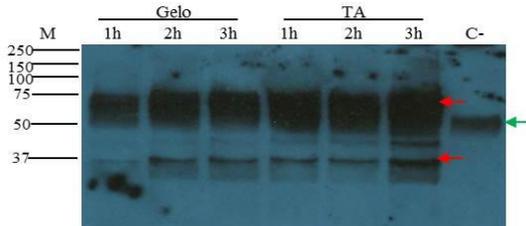


Figura 22. Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab imunoprecipitada de extratos de milho MON810. O extrato foi incubado com anticorpo policlonal anti-Cry1Ab por 1, 2 e 3 horas a temperatura ambiente e em gelo, e imunoprecipitado usando as beads magnéticas. M: marcador de massa molecular (kDa). C-: Controle negativo, amostra de milho isogênico imunoprecipitada. Seta verde indica o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab e a seta vermelha, a proteína Cry1Ab.

As análises de Western Blot das amostras imunoprecipitadas com diferentes tempos de incubação do anticorpo com o extrato protéico revelou que em três horas foi imunoprecipitada a maior quantidade de Cry1Ab do que a menos horas de incubação (Figura 22). Isto foi observado tanto para as incubações realizadas a temperatura ambiente quanto em gelo.

No teste piloto de tempos de incubação maiores que 2 h (3, 4, 5, 6 e 7 h) em gelo foi observado que a quantidade de proteína Cry1Ab imunoprecipitada é levemente maior nas incubações por 5, 6 e 7 h. Porém, em incubações por mais de 5 h não foi constatado aumento da quantidade de proteína Cry1Ab imunoprecipitada (Figura 23).

86 Resultados

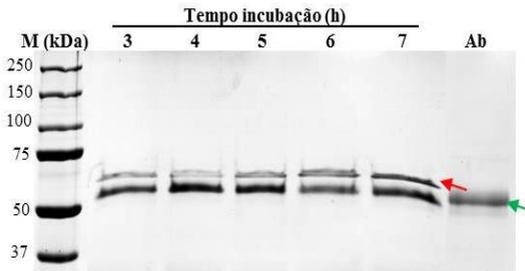


Figura 23. SDS-PAGE de proteína Cry1Ab ativa imunoprecipitada. A proteína Cry1Ab ativa foi incubada com anticorpo policlonal anti-Cry1Ab por 3, 4, 5, 6 e 7 horas em gelo, e imunoprecipitada usando as beads magnéticas. M: marcador de massa molecular (kDa). P: Proteína Cry1Ab ativa (2 µg). Ab: Amostra imunoprecipitada sem proteína Cry1Ab. Seta verde indica o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab e a seta vermelha, a proteína Cry1Ab.

Depois de terem sido realizados os testes pilotos para ajustar o protocolo de imunoprecipitação foram feitos alguns ajustes no mesmo. O protocolo de imunoprecipitação ajustado e usado para o ensaio de imunoprecipitação foi o seguinte: Em um microtubo de 1,5 ml foi colocado 1 ml do extrato protéico e 3 µg do anticorpo policlonal de coelho anti-Cry1Ab (Abraxis) e incubados em gelo por 5 h em agitação constante. Após incubação, 7 µl da suspensão de *beads* magnéticos foram adicionados ao microtubo com o extrato pré-incubado com o anticorpo, e foi incubado em gelo por 30 min em agitação constante. Antes de colocar as *beads* magnéticas, estas foram lavadas previamente com PBS com 0,1.%Tween. Para isso, o tubo com a suspensão de *beads* foi agitado gentilmente e 7 µl da suspensão foram retirados e colocados em um novo microtubo. O microtubo foi colocado no rack magnético e foi retirado o tampão. Depois foi colocado 500 µl PBS com 0,1% Tween 20 e agitado por 10 s. Novamente foi colocado no rack magnético e tampão PBS-T foi removido. Depois da incubação das *beads* com o extrato e o anticorpo, o microtubo foi colocado no rack magnético para remover o extrato. As *beads* foram lavadas 5

vezes com 500 μ l PBS-T. Após a última lavagem, foi colocado 60 μ l de tampão de eluição e incubado por 10 min a 85°C. O microtubo foi colocado no rack, o sobrenadante foi coletado e colocado em um novo tubo. O passo de eluição foi repetido novamente e os sobrenadantes foram juntados e armazenados a 4°C.

As proteínas imunoprecipitadas de milho transgênico e isogênico, precipitadas e solubilizadas em tampão de ureia/tioureia foram quantificadas usando o 2-D Quant Kit, mas a concentração de proteínas foi tão baixa que o *kit* não detectou a presença de proteínas nas amostras. No entanto, a análise de Western Blot revelou a presença de proteína Cry1Ab nas três amostras de milho MON810. Nas amostras de milho isogênico não foi detectada nenhuma banda imunorreativa, como era esperado (Figura 24).

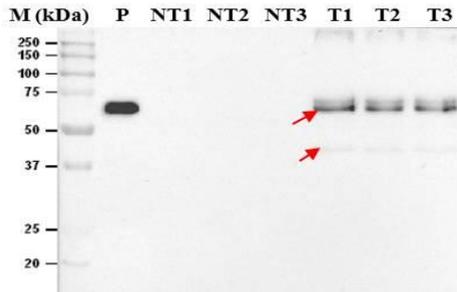


Figura 24. (A) Western Blot mostrando a proteína Cry1Ab das amostras imunoprecipitadas de milho MON810 (T) e do milho isogênico (NT). As amostras foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab e imunoprecipitadas usando as *beads* magnéticas, e posteriormente precipitadas em metanol com acetato de amônio e solubilizadas em tampão uréia/tioureia. M: marcador de massa molecular (kDa). P: proteína purificada Cry1Ab ativa. A seta vermelha indica à proteína Cry1Ab.

Nos géis 2D das amostras transgênicas e isogênicas não GM foram detectados *spots* de leve intensidade de

88 Resultados

aproximadamente 50 kDa e de ~28 kDa (Figura 3A e 3B em Apêndice) que corresponderiam ao anticorpo usado como intermediário para ligar a proteína Cry1Ab às *beads* magnéticas, já que ele foi encontrado em ambas as amostras. Ao comparar esses perfis protéicos 2D das amostras imunoprecipitadas com o SDS-PAGE do mesmo anticorpo imunoprecipitado (Figura 3C do Apêndice) pode-se observar que os *spots* e as bandas têm a mesma massa molecular.

O *spot* da proteína Cry1Ab não foi detectado nos géis 2D das amostras transgênicas e nem foram detectadas as possíveis proteínas parceiras. Isto ocorreu mesmo que as amostras continham a proteína Cry1Ab, segundo a análise de Western Blot (Figura 24).

Para identificar as proteínas imunoprecipitadas nas amostras, estas foram submetidas ao gel SDS-PAGE e foram cortadas as canaletas das amostras em quatro partes, retirando as duas bandas do anticorpo de 50 kDa e 28 kDa (Figura 25) e foram analisadas por Espectrometria de massa.

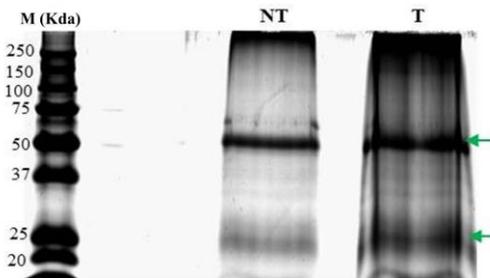


Figura 25. SDS-PAGE das proteínas imunoprecipitadas do milho isogênico (NT) e do milho MON810 (T), precipitadas em metanol com acetato de amônio e solubilizadas em tampão uréia/tioureia. M: marcador de massa molecular (kDa). Seta verde indica o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab.

A análise por Espectrometria de massa mostrou a presença de 142 proteínas na amostra imunoprecipitada de milho

transgênico e 96 proteínas na amostra imunoprecipitada de milho isogênico (Tabela 7). Todas as proteínas identificadas nas amostras isogênicas foram encontradas na amostra transgênica, motivo pelo qual as proteínas identificadas na amostra isogênica seriam consideradas “proteínas contaminantes”. De modo que a amostra transgênica apresentou 46 proteínas exclusivas. Das 46 proteínas, 70% apresentaram homologia com proteínas do milho (*Zea mays*). Também foi identificada a proteína Cry1Ab na amostra transgênica.

90 Resultados

Tabela 7. Proteínas de milho MON810 (T) e de milho isogênico (NT) imunoprecipitadas no ensaio de imunoprecipitação.

Amostra	Nº de acesso	Espécie	Nome da proteína	Mascot score	% Cobertura	Nº peptídeos	MM teórico (kDa)	PI teórico
T	223974123	<i>Zea mays</i>	Unknown	975.18	71.67	8	25.0	5.11
T	194703220	<i>Zea mays</i>	Unknown	925.14	64.91	8	28.0	5.41
T	226502967	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100274453	749.02	55.30	6	28.0	5.66
T	162461501	<i>Zea mays</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic	842.31	49.26	9	36.5	6.89
T	162463469	<i>Zea mays</i>	ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic precursor	464.71	40.00	5	19.1	8.91
T	238011276	<i>Zea mays</i>	Unknown	268.50	32.13	6	34.7	6.77
T	212274479	<i>Zea mays</i>	putative actin family protein isoform 1	368.36	31.03	7	41.7	5.40
T	162460533	<i>Zea mays</i>	photosystem I reaction center subunit VI, chloroplastic precursor	205.42	38.73	3	14.9	10.10
T	224830598	<i>Triclisia sp.</i>	ATP synthase beta chain	2704.56	28.51	10	49.0	5.34

91 Resultados

T	206942071	<i>Aneura pinguis</i>	photosystem I subunit VII	103.42	38.24	2	7.4	6.90
T	194701654	<i>Zea mays</i>	Unknown	159.84	38.14	5	23.5	5.45
T	219885557	<i>Zea mays</i>	Unknown	744.00	36.60	4	32.0	6.39
T	242045970	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g036380	357.63	35.45	4	28.7	5.27
T	224830504	<i>Cissampelos andromorpha</i>	ATP synthase beta chain	4083.27	33.12	13	50.4	5.44
T	223948863	<i>Zea mays</i>	Unknown	372.88	24.68	7	50.7	6.64
T	242082021	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g025680	590.85	34.78	7	28.7	4.84
T	12004115	<i>Douglasia nivalis</i>	ATP synthase beta subunit	2641.13	24.23	9	52.4	5.31
T	11467198	<i>Zea mays</i>	ATP synthase CF1 epsilon subunit	152.11	33.58	2	15.2	5.10
T	226503713	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100273072	91.98	23.15	2	11.8	4.92
T	7706852	<i>Apium graveolens</i>	ATP synthase beta subunit	1717.34	26.88	11	52.9	5.24
T	226530815	<i>Zea mays</i>	LOC100280824 precursor	383.40	32.39	6	33.5	8.21
T	226502058	<i>Zea mays</i>	malate dehydrogenase2	298.89	20.59	6	35.3	8.10
T	229473559	<i>Zea mays</i>	nucleoside diphosphate kinase II	136.20	30.09	3	12.4	9.10

92 Resultados

T	195611174	<i>Zea mays</i>	oxygen-evolving enhancer protein 3-1	182.99	29.72	4	22.7	9.80
T	162463912	<i>Zea mays</i>	oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic precursor	258.00	29.03	4	23.1	9.77
T	3986695	<i>Cichorium intybus</i>	ribosomal protein L12	129.28	26.06	3	15.2	9.86
T	311237	<i>Zea mays</i>	H(+)-transporting ATP synthase	118.58	25.95	3	20.2	4.41
T	255560497	<i>Ricinus communis</i>	ATP synthase subunit beta vacuolar, putative	320.34	25.86	7	45.5	5.16
T	223947099	<i>Zea mays</i>	Unknown	159.80	25.77	2	10.5	6.49
T	326499908	<i>Hordeum vulgare subsp. Vulgare</i>	predicted protein	713.66	25.19	10	41.5	6.80
T	212274977	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100191715	177.67	24.23	3	28.2	6.34
T	162461730	<i>Zea mays</i>	ferritin-1, chloroplastic	298.96	22.92	5	28.0	5.81
T	226497434	<i>Zea mays</i>	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme	685.25	22.49	5	40.6	8.32
T	195639862	<i>Zea mays</i>	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein	93.91	22.06	2	14.7	5.34
T	226491660	<i>Vitis vinifera</i>	uncharacterized protein LOC100273426	123.24	21.99	3	16.0	8.78

93 Resultados

T	147791392	<i>Vitis vinifera</i>	hypothetical protein VITISV_042164	611.05	21.55	5	40.5	8.78
T	326491715	<i>Hordeum vulgare subsp. Vulgare</i>	predicted protein	81.64	21.19	2	16.3	8.05
T	226528403	<i>Zea mays</i>	NADP-dependent oxidoreductase P1	207.10	20.95	4	38.9	6.68
T	223944449	<i>Zea mays</i>	Unknown	153.59	20.88	3	27.6	8.38
T	194701240	<i>Zea mays</i>	Unknown	439.49	20.68	4	29.3	4.87
T	162461304	<i>Zea mays</i>	LOC542205	280.98	20.63	4	23.9	9.10
T	226502632	<i>Zea mays</i>	LOC100282052	148.83	20.60	3	23.8	7.96
T	2331135	<i>Oryza sativa</i>	ribosomal protein L12 homolog	250.81	20.25	2	16.3	5.40
T	226507110	<i>Zea mays</i>	peroxiredoxin bcp	223.80	20.18	3	23.4	9.70
T	162460525	<i>Zea mays</i>	fructokinase-2	465.31	20.00	5	35.5	5.58
T	212275897	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100191797	216.59	20.00	4	44.8	8.24
T	70673280	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated insecticidal active protein Cry1Ab	461,00	13,97	6	80,5	5,88
T	212721648	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100194054 *	145,24	16,00	3	23,6	7,46
T	229473557	<i>Zea mays</i>	nucleoside diphosphate kinase I*	69,34	15,93	2	12,6	9,04
T	205830697	-	RecName: Full=Unknown protein	100.00	2	289.49	1.4	6.37

94 Resultados

18								
NT	205830697	-	RecName: Full=Unknown protein 18	100.00	2	245.14		
T	306755784	-	RecName: Full=Histone H4	100.00	2	119.47	2.2	4.75
NT	306755784	-	RecName: Full=Histone H4	100.00	2	129.27		
T	11467199	Zea mays	ATP synthase CF1 beta subunit	70.28	25	2542.51	54.0	5.43
NT	11467199	Zea mays	ATP synthase CF1 beta subunit	60.04	18	7221.36		
T	242088861	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_09g02 8720	64.91	8	419.39	28.0	5.26
NT	242088861	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_09g02 8720	58.87	7	891.98		
T	194689768	Zea mays	Unknown	61.61	22	2335.23	48.8	8.19
NT	194689768	Zea mays	Unknown	55.17	20	2851.08		
T	226529521	Zea mays	uncharacterized protein LOC100273394	50.33	7	405.36	32.0	5.86
NT	226529521	Zea mays	uncharacterized protein LOC100273394	50.33	7	1173.56		
T	195619530	Zea mays	oxygen-evolving enhancer protein 1	55.62	15	1181.68	34.5	5.64

95 Resultados

NT	195619530	Zea mays	oxygen-evolving enhancer protein 1	48.63	11	2179.75		
T	223975775	Zea mays	Unknown	59.94	15	1055.90	38.1	6.79
NT	223975775	Zea mays	Unknown	47.73	13	1896.35		
T	223975935	Zea mays	Unknown	61.31	17	763.59	43.2	5.34
NT	223975935	Zea mays	Unknown	45.99	13	1573.69		
T	226532904	Zea mays	ribulose biphosphate carboxylase small subunit2	54.25	6	451.75	17.8	7.99
NT	226532904	Zea mays	ribulose biphosphate carboxylase small subunit2	43.14	6	494.77		
T	238624101	Zea mays	uncharacterized protein LOC100191762	45.88	38	4178.25	109.3	6.04
NT	238624101	Zea mays	uncharacterized protein LOC100191762	42.99	36	5254.58		
T	212275394	Zea mays	uncharacterized protein LOC100191984	42.71	7	356.02	21.6	9.76
NT	212275394	Zea mays	uncharacterized protein LOC100191984	42.71	6	803.15		
T	90110817	-	RecName: Full=ATP synthase subunit alpha, chloroplastic; AltName: Full=ATP synthase F1 sector subunit alpha;	47.34	20	1778.24	55.7	6.10

96 Resultados

AltName: Full=F-ATPase subunit alpha								
NT	90110817	-	RecName: Full=ATP synthase subunit alpha, chloroplastic; AltName: Full=ATP synthase F1 sector subunit alpha; AltName: Full=F-ATPase subunit alpha	42.41	18	3788.15		
T	212276009	Zea mays	uncharacterized protein LOC100191684	55.52	15	775.70	35.1	5.66
NT	212276009	Zea mays	uncharacterized protein LOC100191684	42.39	9	2056.50		
T	195618248	Zea mays	chlorophyll a-b binding protein	53.46	8	278.69	27.9	5.27
NT	195618248	Zea mays	chlorophyll a-b binding protein	41.54	6	1151.23		
T	195619796	Zea mays	hypothetical protein	28.27	8	633.68	41.9	5.73
NT	195619796	Zea mays	hypothetical protein	38.74	10	457.42		
T	168586	Zea mays	pyruvate,orthophosphat e dikinase	59.87	34	3238.93	102.4	6.00
NT	168586	Zea mays	pyruvate,orthophosphat e dikinase	38.54	26	6526.02		

97 Resultados

T	22240	Zea mays	GADPH (383 AA)	44.39	11	818.03		
NT	22240	Zea mays	GADPH (383 AA)	36.03	11	1443.70	40.9	7.40
T	75140229	-	RecName: Full=Transketolase, chloroplatic; Short=TK	41.63	17	1003.36		
NT	75140229	-	RecName: Full=Transketolase, chloroplatic; Short=TK	34.37	15	1358.78	72.9	5.72
T	195624268	Zea mays	fruit protein PKIWI502	39.80	9	527.61		
NT	195624268	Zea mays	fruit protein PKIWI502	33.67	7	851.25	31.7	7.15
T	195610706	Zea mays	inorganic pyrophosphatase	34.38	10	619.59		
NT	195610706	Zea mays	inorganic pyrophosphatase	32.64	8	830.35	31.7	6.07
T	194688752	Zea mays	Unknown	39.20	13	961.72		
NT	194688752	Zea mays	Unknown	30.96	10	1384.36	47.2	6.39
T	238013684	Zea mays	Unknown	42.31	6	151.55		
NT	238013684	Zea mays	Unknown	30.77	5	255.58	28.3	6.10
T	162461137	Zea mays	chlorophyll a/b-binding apoprotein CP26 precursor	34.28	6	210.28	30.2	5.49

98 Resultados

NT	162461137	Zea mays	chlorophyll a/b-binding apoprotein CP26 precursor	30.74	5	308.90		
T	343227637	Zea mays	beta-D-glucosidase precursor	31.71	12	1363.18	63.2	7.23
NT	343227637	Zea mays	beta-D-glucosidase precursor	30.63	14	2215.89		
T	162463757	Zea mays	nucleic acid binding protein1	20.79	4	337.22	33.1	4.72
NT	162463757	Zea mays	nucleic acid binding protein1	30.03	5	327.40		
T	195640768	Zea mays	hypothetical protein	75.47	5	120.89	11.7	5.45
NT	195640768	Zea mays	hypothetical protein	28.30	2	438.86		
T	51493526	Imperata cheesemanii	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	29.84	9	283.71	49.7	6.92
NT	51493526	Imperata cheesemanii	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	28.29	8	885.51		
T	194688810	Zea mays	Unknown	43.87	18	1584.25	69.8	6.62
NT	194688810	Zea mays	Unknown	27.67	15	2538.41		
T	195659273	Zea mays	50S ribosomal protein L12-1	35.52	3	94.49	18.8	5.96

99 Resultados

NT	195659273	Zea mays	50S ribosomal protein L12-1	27.32	2	307.25		
T	195622374	Zea mays	fructose-bisphosphate aldolase	41.07	11	459.31	40.2	5.45
NT	195622374	Zea mays	fructose-bisphosphate aldolase	27.20	9	1063.56		
T	194689302	Zea mays	Unknown	26.98	6	347.35	44.3	8.05
NT	194689302	Zea mays	Unknown	26.73	6	430.01		
T	162462751	Zea mays	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	42.86	16	557.40	59.1	6.42
NT	162462751	Zea mays	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	26.40	10	1186.88		
T	336187326	Halodule beaudettei	Actin	30.04	5	185.32	31.3	5.40
NT	336187326	Halodule beaudettei	Actin	26.15	4	250.27		
T	226532407	Zea mays	photosystem I reaction center subunit III	31.11	5	175.52	23.8	9.36
NT	226532407	Zea mays	photosystem I reaction center subunit III	25.78	4	304.52		
T	133711712	Aphelia brizula	cytochrome b-559 alpha subunit protein	25.33	2	84.86	8.6	4.88
NT	133711712	Aphelia brizula	cytochrome b-559 alpha subunit protein	25.33	2	73.07		

100 Resultados

T	195627630	Zea mays	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme	32.24	7	532.02	37.6	8.22
NT	195627630	Zea mays	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme	24.78	5	947.12		
T	242073380	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g019100	42.53	9	354.63	29.6	4.81
NT	242073380	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g019100	23.75	5	945.20		
T	162464321	Zea mays	malate dehydrogenase, cytoplasmic	30.42	7	288.88	35.6	6.09
NT	162464321	Zea mays	malate dehydrogenase, cytoplasmic	23.19	6	520.45		
T	11466770	Oryza sativa Japonica	photosystem II protein D2	26.35	7	350.00	39.5	5.55
NT	11466770	Oryza sativa Japonica	photosystem II protein D2	22.66	5	1149.56		
T	357157399	Brachypodium distachyon]	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic-like	22.16	9	484.71	42.0	6.61
NT	357157399	Brachypodium distachyon]	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic-like	22.16	9	439.57		
T	293334301	Zea mays	uncharacterized protein LOC100383635	36.03	8	241.82	29.2	9.51

101 Resultados

NT	293334301	Zea mays	uncharacterized protein LOC100383635	21.69	4	439.70		
T	118614478	Sorghum bicolor	photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein	31.08	10	407.60	51.9	7.21
NT	118614478	Sorghum bicolor	photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein	21.56	6	1094.06		
T	226533016	Zea mays	ATP synthase subunit gamma, chloroplastic precursor	39.83	10	279.49	39.8	8.19
NT	226533016	Zea mays	ATP synthase subunit gamma, chloroplastic precursor	21.45	6	913.78		
T	226509797	Zea mays	uncharacterized protein LOC100274579	23.63	7	307.86	42.4	5.87
NT	226509797	Zea mays	uncharacterized protein LOC100274579	21.39	6	590.98		
T	11467217	Zea mays	photosystem II 47 kDa protein	25.59	10	452.42	56.1	6.54
NT	11467217	Zea mays	photosystem II 47 kDa protein	21.26	7	1504.90		
T	195619126	Zea mays	triosephosphate isomerase, cytosolic	26.80	5	143.76	26.7	5.19
NT	195619126	Zea mays	triosephosphate isomerase, cytosolic	21.20	4	305.10		
T	148251625	Zea mays	plastid high chlorophyll fluorescence 136 precursor	42.13	13	378.14	43.1	8.76

102 Resultados

NT	148251625	Zea mays	plastid high chlorophyll fluorescence 136 precursor	20.81	6	957.54		
T	162462055	Zea mays	malate dehydrogenase [NADP], chloroplastic precursor	32.64	8	491.55		
NT	162462055	Zea mays	malate dehydrogenase [NADP], chloroplastic precursor	19.68	5	742.76	46.8	6.06
T	224088196	Populus trichocarpa]	actin 3	20.42	5	194.70		
NT	224088196	Populus trichocarpa]	actin 3	19.63	4	212.94	41.7	5.49
T	1703107	-	RecName: Full=Actin- 1	22.28	5	194.70		
NT	1703107	-	RecName: Full=Actin- 1	19.63	4	249.98	41.8	5.69
T	226504688	Zea mays	uncharacterized protein LOC100272933 precursor	39.62	3	139.58		
NT	226504688	Zea mays	uncharacterized protein LOC100272933 precursor	19.34	2	171.55	21.9	6.51
T	116009007	Phyllostachys edulis	PsbA	24.57	7	462.29		
NT	116009007	Phyllostachys edulis	PsbA	19.08	5	722.50	38.3	5.68

103 Resultados

T	118614505	Sorghum bicolor	cytochrome f	42.81	9	226.79	35.4	9.03
NT	118614505	Sorghum bicolor	cytochrome f	19.06	5	521.96		
T	223947203	Zea mays	Unknown	22.79	10	492.75	73.4	6.93
NT	223947203	Zea mays	Unknown	18.89	8	445.77		
T	212722702	Zea mays	uncharacterized protein LOC100194135	32.89	8	255.69	42.0	7.01
NT	212722702	Zea mays	uncharacterized protein LOC100194135	18.72	6	485.61		
T	226498182	Zea mays	LOC100282845	39.51	11	267.39	44.7	6.21
NT	226498182	Zea mays	LOC100282845	18.52	6	688.64		
T	226506962	Zea mays	uncharacterized LOC100276026	36.12	8	131.18	32.5	5.86
NT	226506962	Zea mays	uncharacterized LOC100276026	18.39	4	683.58		
T	194702698	Zea mays	Unknown	31.91	8	246.65	32.4	6.55
NT	194702698	Zea mays	Unknown	18.09	4	559.07		
T	226499152	Zea mays	adenylate kinase1	39.79	7	239.02	31.1	8.05
NT	226499152	Zea mays	adenylate kinase1	17.25	4	402.85		
T	120670	-	RecName: Full=Glyceraldehyde- 3-phosphate	49.26	10	344.31	36.5	6.96

104 Resultados

dehydrogenase 1, cytosolic								
NT	120670	-	RecName: Full=Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic	17.21	4	935.31		
T	226495067	Zea mays	uncharacterized protein LOC100280354	24.28	13	417.53	66.4	4.98
NT	226495067	Zea mays	uncharacterized protein LOC100280354	16.56	9	712.87		
T	116008991	Phyllostachys edulis	ribosomal protein S7	24.34	4	244.28	17.1	11.77
NT	116008991	Phyllostachys edulis	ribosomal protein S7	16.38	6	208.08		
T	223949369	Zea mays	Unknown	34.42	8	196.81	40.0	8.98
NT	223949369	Zea mays	Unknown	16.26	5	545.17		
T	223948607	Zea mays	Unknown	32.90	8	205.32	42.8	5.36
NT	223948607	Zea mays	Unknown	16.19	4	865.09		
T	157830114	-	Chain A, Structure Of Glutathione S-Transferase Iii In Apo Form	25.00	4	104.32	23.4	6.42
NT	157830114	-	Chain A, Structure Of Glutathione S-	15.74	2	192.11		

105 Resultados

Transferase Iii In Apo Form									
T	162458005	Zea mays	photosystem II subunit29	23.71	6	183.02	31.4	5.50	
NT	162458005	Zea mays	photosystem II subunit29	15.46	3	618.22			
T	226506366	Zea mays	sedoheptulose biphosphatase1	29.61	9	261.45	41.8	6.40	
NT	226506366	Zea mays	sedoheptulose biphosphatase1	15.32	5	647.50			
T	162460681	Zea mays	sucrose synthase 2	20.96	13	393.52	92.9	6.48	
NT	162460681	Zea mays	sucrose synthase 2	15.07	9	656.42			
T	195613254	Zea mays	chlorophyll a-b binding protein 8	37.45	5	126.58	29.0	8.97	
NT	195613254	Zea mays	chlorophyll a-b binding protein 8	14.98	2	476.69			
T	194703906	Zea mays	Unknown	31.17	6	120.85	26.9	7.12	
NT	194703906	Zea mays	Unknown	14.98	3	372.17			
T	11467188	Zea mays	ATP synthase CF0 B subunit	21.31	3	110.44	21.0	9.23	
NT	11467188	Zea mays	ATP synthase CF0 B subunit	14.75	2	142.62			
T	226508704	Zea mays	elongation factor Tu	35.91	13	273.97	50.5	6.48	
NT	226508704	Zea mays	elongation factor Tu	14.41	5	1163.14			

106 Resultados

T	223948631	Zea mays	Unknown	36.16	17	528.51	84.4	5.77
NT	223948631	Zea mays	Unknown	14.36	8	1121.76		
T	219885633	Zea mays	Unknown	21.42	10	324.59	71.1	5.22
NT	219885633	Zea mays	Unknown	14.18	8	541.16		
T	162459293	Zea mays	aquaporin PIP2-1	27.93	4	273.79	30.2	7.84
NT	162459293	Zea mays	aquaporin PIP2-1	14.14	3	321.77		
T	195612198	Zea mays	fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 1	26.04	6	215.49	38.2	6.61
NT	195612198	Zea mays	fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 1	13.57	3	477.18		
T	226493643	Zea mays	uncharacterized protein LOC100272829	20.45	5	123.94	41.5	8.37
NT	226493643	Zea mays	uncharacterized protein LOC100272829	12.12	4	257.10		
T	242070213	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g00 4590	23.71	9	294.47	41.9	6.07
NT	242070213	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g00 4590	12.11	5	420.26		
T	242083308	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g00 9580	20.23	11	393.32	74.4	5.26

107 Resultados

NT	242083308	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g009580	12.11	6	634.67		
T	162463509	Zea mays	photosystem II subunit PsbS1	23.02	4	147.48	27.7	9.09
NT	162463509	Zea mays	photosystem II subunit PsbS1	12.08	2	422.41		
T	242075576	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g014590	23.78	15	283.85	102.1	6.73
NT	242075576	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g014590	12.05	9	774.35		
T	219362417	Zea mays	uncharacterized protein LOC100216729	23.71	6	229.28	31.4	5.50
NT	219362417	Zea mays	uncharacterized protein LOC100216729	12.03	2	539.68		
T	226531556	Zea mays	hypothetical protein precursor	26.21	7	130.98	38.3	8.38
NT	226531556	Zea mays	hypothetical protein precursor	11.97	3	545.30		
T	226498448	Zea mays	estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	23.44	3	129.14	27.9	6.11
NT	226498448	Zea mays	estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	11.72	2	205.92		
T	226508814	Zea mays	aspartate aminotransferase	24.62	7	127.11	50.3	8.07

108 Resultados

NT	226508814	Zea mays	aspartate aminotransferase	10.46	4	295.02		
T	162464003	Zea mays	lipoxygenase10	21.22	14	324.15	102.0	6.57
NT	162464003	Zea mays	lipoxygenase10	10.39	8	1020.57		
T	6730082	-	Chain A, A 30 Angstrom U-Shaped Catalytic Tunnel In The Crystal Structure Of Polyamine Oxidase	20.55	6	157.76	53.6	5.95
NT	6730082	-	Chain A, A 30 Angstrom U-Shaped Catalytic Tunnel In The Crystal Structure Of Polyamine Oxidase	10.17	3	352.69		
T	226509632	Zea mays	uncharacterized protein LOC100276340	23.83	4	94.27	24.9	5.14
NT	226509632	Zea mays	uncharacterized protein LOC100276340	8.51	2	246.90		
T	194707246	Zea mays	Unknown	21.35	7	90.91	38.4	7.87
NT	194707246	Zea mays	Unknown	8.43	2	400.92		
T	194702488	Zea mays	Unknown	37.68	8	119.37	29.5	8.22
NT	194702488	Zea mays	Unknown	8.33	2	337.42		
T	226506958	Zea mays	peptidyl-prolyl cis- trans isomerase	34.98	9	127.51	46.6	5.01

109 Resultados

NT	226506958	Zea mays	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	8.22	2	479.53		
T	194707774	Zea mays	Unknown	20.38	6	101.39	33.8	8.25
NT	194707774	Zea mays	Unknown	7.32	2	231.66		
T	195639018	Zea mays	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	22.83	7	67.44	50.0	6.55
NT	195639018	Zea mays	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	6.98	2	328.89		
T	293332601	Zea mays	uncharacterized protein LOC100383416	21.39	14	109.69	102.0	6.64
NT	293332601	Zea mays	uncharacterized protein LOC100383416	3.15	3	612.99		
T	226531522	Zea mays	LOC100286153	21.44	10	91.44	84.4	6.20
NT	226531522	Zea mays	LOC100286153	2.61	2	513.84		

*Proteínas que também foram identificadas na banda de 18 kDa do ensaio de Ligand Blot de proteínas de milho MON810 com Cry1Ab.

5.4.2 Ensaio de Ligand Blot de proteínas de milho com a proteína Cry1Ab

A presença de proteína Cry1Ab foi verificada nos extratos proteicos de milho por meio das tiras de fluxo lateral. Nos extratos de milho MON810 foi encontrada a proteína Cry1Ab, já no extrato de milho isogênico a proteína Cry1Ab estava ausente, como era esperado (Figura 4 do Apêndice).

As análises de Western Blot dos extratos protéicos de milho MON810 indicam a presença de bandas imunorreativas de aproximadamente 70 kDa, 65 kDa, 36 kDa e 18 kDa nos extrato protéico de milho MON810 extraído usando o protocolo de Rocca (Figura 26A). No extrato protéico de milho MON810 usando o protocolo de Mekawi (2009) foram encontradas três bandas imunorreativas, 70 kDa, 65 kDa e 36 kDa, e a banda de 18 kDa foi ausente. A banda imunorreativa de 18 kDa foi encontrada também no Western Blot da amostra de milho isogênico extraída usando o protocolo de Rocca, mas não foi encontrada na amostra de milho isogênico extraída com o protocolo de Mekawi (2009).

A análise de Ligand blot revelou que a proteína Cry1Ab ligou-se as proteínas de aproximadamente 70 kDa, 65 kDa, 36 kDa e 18 kDa (Figura 26B) nos extratos protéicos de milho MON810 extraídos usando a metodologia de Mekawi (2009) e de Rocca pH 10,6. O Ligand blot das proteínas de milho isogênico extraído com ambos os protocolos revelou que a proteína Cry1Ab ligou-se a uma proteína de aproximadamente 18 kDa.

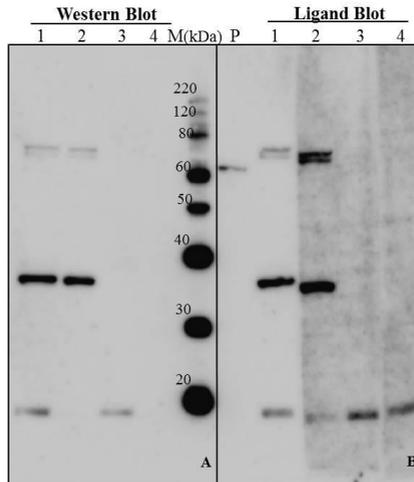


Figura 26. Ligand Blot de proteínas de milho com Cry1Ab. A: Incubadas sem proteína Cry1Ab. B: Incubadas com 10 μ g/ml da proteína purificada Cry1Ab ativa. Linha 1: Amostra protéica de milho MON810 extraída de acordo com o protocolo de Rocca pH 10,6. Linha 2: Amostra protéica de milho MON810 extraída de acordo com o protocolo de Mekawi (2009). Linha 3: Amostra protéica de milho isôgenico extraída de acordo com o protocolo de Rocca pH 10,6. Linha 4: Amostra protéica de milho isôgenico extraída de acordo com o protocolo de Mekawi (2009). P: proteína ativada Cry1Ab. M: Marcador molecular (kDa).

A análise de Espectrometria de massa revelou que em todas as bandas provenientes dos extratos protéicos de milho isôgenico a proteína Cry1Ab estava ausente. Nas bandas de 70 kDa e 65 kDa dos dois extratos protéicos de milho MON810 foi detectada a Cry1Ab, assim como na banda de 18 kDa da amostra transgênica extraída de acordo com o protocolo de Rocca (Tabela 8). No entanto, não foi detectada na banda de 18 kDa da amostra protéica de milho MON810 extraído com o protocolo de Mekawi (2009), nem nas bandas de 36 kDa dos dois extratos protéicos de milho MON810. Mesmo que o Western Blot revelou a presença da banda imunorreativa de 36 kDa nas duas amostras transgênicas e nas bandas de 18 kDa das amostras proteicas de milho MON810 e isôgenico extraídas com o protocolo de Rocca.

112 Resultados

Além de ter sido identificada a proteína Bt nas amostras também foram identificadas outras proteínas. Foram identificadas 42 e 13 proteínas na banda de 36 kDa da amostra transgênica extraída com o protocolo de Mekawi e de Rocca, respectivamente (Tabela 8). Esses dois valores correspondem às proteínas presentes só nas amostras transgênicas, pois previamente foram retiradas as proteínas identificadas na contraparte (a banda do extrato isogênico), já que na amostra isogênica não foi evidenciado nenhum sinal no ensaio de Western Blot.

Nas bandas de 18 kDa das amostras proteicas de milho MON810 e de milho isogênico extraídos segundo o protocolo de Mekawi (2009) foram identificadas 19 e 12 proteínas, respectivamente, das quais 9 proteínas foram comuns aos dois tipos de genótipos, milho MON810 e seu isogênico (Tabela 8). Na banda do mesmo tamanho das amostras proteicas extraídas com o protocolo de Rocca foram identificadas 67 proteínas para o milho isogênico (Tabela 8).

Tabela 8. Proteínas identificadas nas amostras de milho MON810 (T) e isogênico (NT) extraídas de acordo com o protocolo de Mekawi (Mek) ou Rocca pH10,6 (Roc). T*/NT*: possíveis proteínas de milho MON810 e isogênico, extraídas de acordo com o protocolo de Mekawi, que se ligariam a proteína Cry1Ab segundo o ensaio de Ligand Blot de proteínas de milho com Cry1Ab. T^e: proteínas exclusivas da amostra transgênica. NT^e: proteínas exclusivas da amostra isogênica.

Amostra		Nº de acesso	Espécie	Nome da proteína	Mascot score	% Cobertura	Nº peptídeos	MM teórico (kDa)	PI teórico
Banda 70kDa	T ^e	169930476	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated Cry1Ab	54.15	3.58	2	69.3	6.40
Banda 65kDa	T ^e	169930477	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated Cry1Ab	132.45	5.20	3	69.3	6.40
Banda 36kDa	T ^e	102139876	<i>Musa acuminata</i>	porphobilinogen deaminase, chloroplast (hydroxymethylbilane synthase) (pre-uroporphyrinogen synthase), putative	70.78	8.23	2	35.8	8.16
		115450493	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	Os03g0129300	290.49	17.34	6	47.1	6.68
		118614505	<i>Sorghum bicolor</i>	cytochrome f	802.38	29.69	10	35.4	9.03

114 Resultados

T ^e	125540364	<i>Oryza sativa</i> <i>Indica</i> <i>Group</i>	hypothetical protein OsI_08139	73.33	6.27	2	34.2	5.11
T ^e	125552186	<i>Oryza sativa</i> <i>Indica</i> <i>Group</i>	hypothetical protein OsI_19813	216.71	10.44	3	32.2	7.90
T ^e	194701900	<i>Zea mays</i>	unknown	115.13	8.47	2	32.7	5.02
T ^e	195622012	<i>Zea mays</i>	membrane- associated 30 kDa protein	87.53	9.18	2	35.0	9.48
T ^e	226494783	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100274518	107.94	6.77	2	34.3	8.69
T ^e	226529563	<i>Zea mays</i>	alpha-soluble NSF attachment protein	62.25	5.88	2	32.4	5.17
T ^e	242055003	<i>Sorghum</i> <i>bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_ 03g040100	118.88	5.22	2	41.3	6.02
T ^e	32401388	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	14-3-3 protein	395.12	20.08	4	28.4	4.83

115 Resultados

		3334116	<i>Triticum aestivum</i>	RecName: Full=ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial; AltName: Full=ADP/ATP translocase 1; AltName: Full=Adenine nucleotide translocator 1; Short=ANT 1; Flags: Precursor	253.94	15.71	5	35.9	9.79
	T ^e								
		5822248	<i>Hordeum vulgare</i>	Chain A, Crystal Structure Of Prophytepsin, A Zymogen Of A Barley Vacuolar Aspartic Proteinase.	70.72	4.39	2	51.2	5.44
	T ^e								
Banda 18kDa	T ^e	169930478	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated Cry1Ab	81.56	3.74	2	69.3	6.40
	NT	12452	<i>Zea mays</i>	ribosomal protein L16	169.89	57.14	2	5.4	9.52
Banda 18kDa	NT	22240	<i>Zea mays</i>	GADPH (383 AA)	248.26	18.02	4	40.9	7.40

116 Resultados

NT ^e	2462736	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative ADP-ribosylation factor	75.66	18.58	2	12.7	8.69
NT	11467188	<i>Zea mays</i>	ATP synthase CF0 B subunit	457.73	25.14	5	21.0	9.23
NT	11467195	<i>Zea mays</i>	NADH dehydrogenase subunit J	339.82	45.28	6	18.7	6.52
NT	11467199	<i>Zea mays</i>	ATP synthase CF1 beta subunit	429.80	19.28	6	54.0	5.43
NT ^e	62738111	<i>Zea mays</i>	Chain A, Pyruvate Phosphate Dikinase From Maize	84.82	2.05	2	95.1	5.40
NT ^e	115443875	<i>Zea mays</i>	Os02g0121300 [Oryza sativa Japonica Group]	173.92	16.28	2	18.3	8.34
NT ^e	162458009	<i>Zea mays</i>	eukaryotic translation initiation factor 5A	130.07	10.00	2	17.5	5.99
NT	162463912	<i>Zea mays</i>	oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic precursor	1187.87	38.25	8	23.1	9.77

117 Resultados

NT	194033182	<i>Brachypodium distachyon</i>	ribosomal protein S8	277.65	34.56	5	15.7	11.12
NT ^e	194688752	<i>Zea mays</i>	unknown	194.98	14.48	4	47.2	6.39
NT	194696816	<i>Zea mays</i>	unknown	375.91	32.89	5	16.5	6.80
NT ^e	194696822	<i>Zea mays</i>	unknown	104.40	32.00	2	10.9	4.51
NT	194699430	<i>Zea mays</i>	unknown	180.85	29.66	3	13.4	9.99
NT ^e	194699568	<i>Zea mays</i>	unknown	72.92	15.86	2	16.2	10.10
NT ^e	194700926	<i>Zea mays</i>	unknown	162.97	19.09	3	22.8	9.85
NT	194702912	<i>Zea mays</i>	unknown	147.86	21.76	3	20.7	6.90
NT ^e	195605262	<i>Zea mays</i>	hypothetical protein	201.66	23.42	2	11.4	4.79
NT	195615416	<i>Zea mays</i>	pathogenesis-related protein 1	122.53	21.88	2	17.0	5.54

118 Resultados

NT	195616762	<i>Zea mays</i>	oxygen evolving enhancer protein 3	688.33	21.66	4	24.1	9.98
NT	195618426	<i>Zea mays</i>	60S ribosomal protein L22-2	136.76	17.69	2	14.4	9.45
NT	195618584	<i>Zea mays</i>	extracellular ribonuclease LE precursor	78.39	10.20	2	26.9	8.10
NT	195618768	<i>Zea mays</i>	40S ribosomal protein S14	305.63	30.00	3	16.4	10.55
NT ^c	195619530	<i>Zea mays</i>	oxygen-evolving enhancer protein 1	129.37	9.42	3	34.5	5.64
NT ^c	195626656	<i>Zea mays</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	80.49	10.95	2	21.8	6.07
NT ^c	195634659	<i>Zea mays</i>	fructose-bisphosphate aldolase	121.01	5.67	2	41.8	7.83
NT	195656199	<i>Zea mays</i>	hypothetical protein	194.76	36.84	2	6.6	9.79
NT	195659273	<i>Zea mays</i>	50S ribosomal protein L12-1	136.74	31.15	3	18.8	5.96

119 Resultados

NT ^c	205830697	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	RecName: Full=Unknown protein 18	157.04	100.00	2	1.4	6.37
NT	212275394	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100191984	1346.59	42.71	7	21.6	9.76
NT ^c	212276009	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100191684	129.37	9.25	3	35.1	5.66
NT	212720671	<i>Zea mays</i>	60 ribosomal protein L14	229.02	25.37	3	15.3	10.17
NT	212721648	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100194054	938.08	52.00	10	23.6	7.46
NT	223946969	<i>Zea mays</i>	unknown	305.61	33.10	4	15.8	4.81
NT ^c	223947099	<i>Zea mays</i>	unknown	170.10	25.77	2	10.5	6.49
NT	223949229	<i>Zea mays</i>	unknown	159.76	18.87	2	22.5	7.44
NT	223974989	<i>Zea mays</i>	unknown	165.70	8.40	2	26.0	9.01
NT	223975935	<i>Zea mays</i>	unknown	479.47	30.41	9	43.2	5.34

120 Resultados

NT	226491708	<i>Zea mays</i>	LOC100286380	108.04	21.65	3	20.2	8.50
NT	226493157	<i>Zea mays</i>	40S ribosomal protein S16	131.43	14.86	2	16.7	10.67
NT	226493800	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100273341	169.87	21.05	3	17.7	10.74
NT ^c	226496151	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100275297	191.01	27.40	3	15.9	5.10
NT	226498960	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100276761	216.61	18.37	3	21.4	10.33
NT	226502632	<i>Zea mays</i>	LOC100282052	503.10	30.04	5	23.8	7.96
NT ^c	226503713	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100273072	231.02	42.59	4	11.8	4.92
NT	226503797	<i>Zea mays</i>	photosystem I reaction center subunit IV A	272.09	47.48	4	14.8	9.79
NT	226505300	<i>Zea mays</i>	LOC100283392	130.57	13.58	2	17.3	5.02
NT	226507086	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100273120	331.16	22.51	4	25.3	7.80

121 Resultados

NT	226507110	<i>Zea mays</i>	peroxiredoxin bcp	798.90	38.07	8	23.4	9.70
NT ^e	226507244	<i>Zea mays</i>	OB-fold nucleic acid binding domain containing protein	86.54	19.18	2	15.5	8.72
NT	226507418	<i>Zea mays</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA	161.72	13.91	3	24.6	9.39
NT	226509864	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100277108	203.12	22.70	3	18.3	8.13
NT	226530383	<i>Zea mays</i>	electron carrier/ electron transporter/ iron ion binding protein	89.45	21.99	2	20.8	7.66
NT ^e	226532375	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100278309	66.73	12.50	2	19.5	5.25
NT	226532407	<i>Zea mays</i>	photosystem I reaction center subunit III	1077.77	36.00	7	23.8	9.36

122 Resultados

NT ^e	226532904	<i>Zea mays</i>	ribulose bisphosphate carboxylase small subunit2	77.88	19.61	2	17.8	7.99
NT ^e	229473559	<i>Zea mays</i>	nucleoside diphosphate kinase II	179.87	15.04	2	12.4	9.10
NT ^e	242036777	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_ 01g045750	108.13	15.64	2	18.9	9.70
NT ^e	242092298	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_ 10g006380	707.50	31.60	7	22.9	9.70
NT	242096768	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_ 10g027590	180.72	11.05	2	20.9	9.80
NT	269993586	<i>Zea mays</i>	chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase	304.95	28.26	3	18.7	5.62
NT	293333366	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100383080	212.73	12.73	2	17.5	7.33

123 Resultados

Mek	NT ^e	297605324	<i>Zea mays</i>	Os06g0185900 [Oryza sativa Japonica Group]	161.92	35.82	2	7.4	9.09	
		308081212	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100501499	159.95	23.20	3	17.6	4.88	
		357470665	<i>Medicago truncatula</i>	Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein	90.36	3.95	2	81.0	6.83	
		357471541	<i>Medicago truncatula</i>	Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein	298.39	3.62	3	107.3	7.49	
	Banda 70kDa	T ^e	169930479	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated Cry1Ab	146.91	7.42	4	69.3	6.40
	Banda 65kDa	T ^e	169930480	<i>Bacillus thuringiensis</i>	truncated Cry1Ab	49.27	1.77	1	69.3	6.40
	Banda 36kDa	T ^e	11467199	<i>Zea mays</i>	ATP synthase CF1 beta subunit	445.70	19.68	8	54.0	5.43
		T ^e	13096165	<i>Zea mays</i>	Chain A, Crystal Structure Of The Complex Between Ferredoxin And Ferredoxin-	371.83	22.61	5	35.3	7.25

124 Resultados

Nadp+ Reductase								
T ^e	158302779	<i>Fragaria x ananassa</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	103.17	17.37	2	17.5	9.22
T ^e	194699856	<i>Zea mays</i>	unknown	297.96	25.14	6	39.3	5.64
T ^e	194701526	<i>Zea mays</i>	unknown	106.10	9.12	3	37.3	6.11
T ^e	194701900	<i>Zea mays</i>	unknown	204.72	15.31	3	32.7	5.02
T ^e	194704164	<i>Zea mays</i>	unknown	112.01	10.33	2	25.9	6.20
T ^e	194707774	<i>Zea mays</i>	unknown	239.28	14.97	4	33.8	8.25
T ^e	195610706	<i>Zea mays</i>	inorganic pyrophosphatase	103.78	7.99	2	31.7	6.07
T ^e	195619262	<i>Zea mays</i>	gibberellin receptor GID1L2	92.32	10.65	2	32.8	5.05
T ^e	195629642	<i>Zea mays</i>	lichenase-2 precursor	66.54	7.14	2	34.9	6.06

125 Resultados

T ^e	195634659	<i>Zea mays</i>	fructose-bisphosphate aldolase	598.22	20.36	8	41.8	7.83
T ^e	195639862	<i>Zea mays</i>	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein	146.21	32.35	3	14.7	5.34
T ^e	212276289	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100191234	139.77	9.38	3	14.3	8.25
T ^e	2130560	<i>Glycine max</i>	elongation factor-1 alpha	107.21	30.71	4	37.8	6.38
T ^e	219885435	<i>Zea mays</i>	unknown	179.18	23.08	4	22.4	5.99
T ^e	219887877	<i>Zea mays</i>	unknown	112.10	11.08	3	36.2	6.61
T ^e	223945285	<i>Zea mays</i>	unknown	62.51	10.13	2	25.1	4.96
T ^e	223949895	<i>Zea mays</i>	unknown	171.55	6.12	2	41.2	5.03
T ^e	224032891	<i>Zea mays</i>	unknown	453.98	34.83	8	32.3	6.19

126 Resultados

T ^e	226491163	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100277385 precursor	121.85	6.14	2	38.0	8.27
T ^e	226491894	<i>Zea mays</i>	hypothetical protein precursor	168.04	13.14	4	34.2	7.55
T ^e	226491934	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100272818	99.40	9.97	3	36.7	7.91
T ^e	226493908	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100277287	69.11	6.75	2	33.2	5.76
T ^e	226496125	<i>Zea mays</i>	polygalacturonase inhibitor 1 precursor	91.27	16.90	2	30.0	8.12
T ^e	226496743	<i>Zea mays</i>	50S ribosomal protein L1	136.84	9.57	3	37.2	8.66
T ^e	226497434	<i>Zea mays</i>	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme	428.20	18.70	5	40.6	8.32
T ^e	226504688	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100272933 precursor	92.59	13.21	2	21.9	6.51
T ^e	226506256	<i>Zea mays</i>	ribokinase	107.51	6.59	2	37.5	6.27

127 Resultados

T ^e	226506612	<i>Zea mays</i>	esterase D	105.37	9.31	2	31.9	6.61
T ^e	226529521	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100273394	235.82	25.49	4	32.0	5.86
T ^e	226531007	<i>Zea mays</i>	proteasome subunit alpha type 1	263.04	23.36	4	30.0	5.27
T ^e	226532904	<i>Zea mays</i>	ribulose biphosphate carboxylase small subunit2	98.16	21.57	2	17.8	7.99
T ^e	239052128	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100192829	92.68	9.36	3	39.3	8.94
T ^e	242046136	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g037840	82.51	7.08	2	33.4	8.65
T ^e	242046924	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g042850	152.79	12.85	3	33.4	6.96
T ^e	242057375	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_03g014740	103.42	7.77	2	32.0	6.15

128 Resultados

T ^e	242061114	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g008590	105.29	8.31	2	33.5	7.85
T ^e	242073380	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g019100	437.61	30.27	7	29.6	4.81
T ^e	326506704	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	predicted protein	68.38	6.43	2	40.9	6.40
T ^e	342350908	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	Chain C, Structure Of Florigen Activation Complex Consisting Of Rice Florigen Hd3a, 14-3-3 Protein Gf14 And Rice Fd Homolog Osfd1	285.27	22.92	4	27.1	5.02
T ^e	62738111	<i>Zea mays</i>	Chain A, Pyruvate Phosphate Dikinase From Maize	109.60	3.31	3	95.1	5.40

130 Resultados

T*	162464399	<i>Zea mays</i>	GR1a protein precursor	176.24	26.32	3	13.5	7.96
T*	194696816	<i>Zea mays</i>	unknown	237.50	32.89	5	16.5	6.80
T ^e	195618768	<i>Zea mays</i>	40S ribosomal protein S14	98.20	16.00	2	16.4	10.55
T ^e	195619530	<i>Zea mays</i>	oxygen-evolving enhancer protein 1	149.33	16.72	4	34.5	5.64
T ^e	195655095	<i>Zea mays</i>	hypothetical protein	93.65	19.57	2	10.5	6.14
T ^e	212720671	<i>Zea mays</i>	60 ribosomal protein L14	127.98	25.37	3	15.3	10.17
T*	212721648	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100194054	544.97	35.11	7	23.6	7.46
T ^e	223947099	<i>Zea mays</i>	unknown	85.29	18.56	2	10.5	6.49
T*	226498960	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100276761	180.40	18.37	3	21.4	10.33
T ^e	226507086	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100273120	135.64	18.18	3	25.3	7.80

131 Resultados

	T*	229473557	<i>Zea mays</i>	nucleoside diphosphate kinase I	72.30	15.93	2	12.6	9.04
	T*	242092298	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_10g006380	205.90	22.64	3	22.9	9.70
	T ^c	242093640	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_10g024630	66.47	36.25	2	8.5	4.54
	T*	269993586	<i>Zea mays</i>	chloroplatic Cu/Zn superoxide dismutase	368.81	28.26	3	18.7	5.62
Banda 18kDa	NT*	400404	<i>Zea mays</i>	RecName: Full=Nucleoside diphosphate kinase I; AltName: Full=Nucleoside diphosphate kinase I; Short=NDK I; Short=NDP kinase I; Short=NDPK I	138.27	16.89	2	16.3	9.80

132 Resultados

NT*	11466825	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	ribosomal protein S8	138.91	19.12	2	15.6	7.46
NT ^c	11467195	<i>Zea mays</i>	NADH dehydrogenase subunit J	206.68	27.04	3	18.7	5.62
NT*	162464399	<i>Zea mays</i>	GR1a protein precursor	115.02	16.54	2	13.5	6.52
NT*	194696816	<i>Zea mays</i>	unknown	183.81	22.82	3	16.5	6.80
NT ^c	195611174	<i>Zea mays</i>	oxygen-evolving enhancer protein 3-1	362.08	38.68	6	22.7	10.98
NT*	212721648	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100194054	482.68	35.11	7	23.6	6.95
NT*	226498960	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein LOC100276761	128.23	11.73	2	21.4	7.96
NT ^c	226505300	<i>Zea mays</i>	LOC100283392	114.38	13.58	2	17.3	9.04
NT*	229473557	<i>Zea mays</i>	nucleoside diphosphate kinase I	104.17	15.93	2	12.6	9.70
NT*	242092298	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_	152.75	13.68	2	22.9	5.02

10g006380								
NT*	269993586	<i>Zea mays</i>	chloroplatic Cu/Zn superoxide dismutase	218.34	28.26	3	18.7	10.33

134 Resultados

6 DISCUSSÃO

6.1 Quantificação da proteína Cry1Ab por DAS-ELISA

Nesse estudo foi verificado que a distribuição longitudinal do conteúdo da proteína Cry1Ab na folha de milho MON810 (estádio V2) é desigual, sendo que o conteúdo da proteína no limbo é 6 vezes maior que na bainha. Resultado semelhante foi observado no estudo de Székács et al. (2010) com folhas no estágio R3 (RITCHIE et al., 1992), para as quais a concentração de proteína foi menor na bainha e aumentou gradualmente em direção à ponta, atingindo a maior concentração na parte média, onde a concentração permaneceu estável sempre que não tinha tecido necrosado presente na ponta. Em um teste preliminar do presente trabalho, foi quantificada a proteína Cry1Ab nas pontas das folhas e os valores foram semelhantes aos da parte média da folha (dado não mostrado), considerando que por se tratar de pontas de plantas jovens, as mesmas não continham áreas necróticas, já que a necrose está relacionada com a diminuição da concentração da proteína Cry1Ab (NGUYEN & JEHLE, 2007; SZÉKÁCS et al., 2010). Esse mesmo resultado foi reportado por Dutton et al. (2005) em folhas de diferentes posições na planta de milho Bt11, o qual expressa uma versão truncada de proteína Cry1Ab.

No estudo de Székács et al. (2010a) o conteúdo da proteína Cry1Ab na bainha foi próximo ao conteúdo encontrado no caule, considerando que a expressão da proteína Cry1Ab no caule é menor que na folha (NGUYEN & JEHLE, 2007; SZÉKÁCS et al., 2010). Isto se deve ao fato de que a lâmina foliar tem alto conteúdo de clorofila e foi demonstrado que tecidos verdes com alto teor de clorofila têm maior expressão da proteína quando comparado aos tecidos amarelos com menor teor (CRAIG et al., 2003; SZÉKÁCS et al., 2010b).

O conteúdo da proteína Cry1Ab que foi encontrado nas folhas ($55,56 \pm 6,54$ $\mu\text{g/g}$ massa fresca) foi maior do que o encontrado em outros estudos (Tabela 2). Uma possível explicação é que as plantas foram fertilizadas com solução nutritiva própria para hortaliças seis dias depois de serem colocadas para germinar. Essas soluções contêm nitrogênio, o qual é essencial para a produção da proteína Cry1Ab, já que foi observado que o maior nível de nitrogênio na planta coincidiu com maior produção da proteína Bt (BRUNS & ABEL, 2003; COVIELLA et al., 2000). Este resultado pode ser justificado pelo fato de que o nitrogênio está envolvido na síntese de proteínas além de estar correlacionado positivamente com teor de clorofila na folha (BLACKMER & SCHEPERS, 2013), de tal modo que os tecidos com alto teor de clorofila expressaram maior proteína Cry1ab (ABEL & ADAMCZYK, 2004; SZÉKÁCS et al., 2010). Também deve ser considerado que a concentração da proteína na folha depende do estágio fenológico da planta (LIU & WANG, 2003; NGUYEN & JEHLE, 2007; SZÉKÁCS et al., 2010b), sendo que no presente estudo foram utilizadas plantas no estágio V2. A expressão mais intensa da proteína ocorre no estágio de cinco folhas (V5) (SZÉKÁCS et al., 2010b).

Por outro lado, a maioria dos estudos de quantificação da toxina Cry1Ab (60-70 kDa) em milho MON810 foram realizados usando os *kits* de ELISA quantitativos, os quais eram desenhados para reconhecer a protoxina Cry1Ab (130 kDa) e usavam uma curva padrão da protoxina. No entanto, esses *kits* foram retirados do mercado e agora só encontram-se disponíveis *kits* de ELISA qualitativos. Estes também são desenhados para reconhecer protoxina Cry1Ab e têm sido usados para quantificar a toxina com auxílio de uma curva padrão da protoxina Cry1Ab realizada pelo mesmo usuário. Então, o uso da protoxina Cry1Ab de 130 kDa na curva padrão e comparar a absorbância desta com a absorbância da toxina presente na planta (60-70kDa) pode ter

subestimado a concentração real do que de fato foi produzido na planta. Há ainda que considerar que esses *kits* usam anticorpos que reconhecem a protoxina e que podem reconhecer a toxina produzida pela planta, mas a chance de detecção da toxina vai ser menor devido à baixa afinidade do anticorpo à versão curta da proteína Cry1Ab (toxina) produzida em plantas transgênicas, que perdeu ou alterou epítomos antigênicos (SZÉKÁCS et al., 2010b).

Portanto, os valores das concentrações da toxina Cry1Ab reportados na literatura serão menores do que realmente são expressos na planta (SZÉKÁCS et al., 2010b). Também é necessário considerar que em alguns estudos foi usada a massa seca para calcular o conteúdo da proteína na planta e em outros a massa fresca, o qual limita a comparação dos dados (THEN & LORCH, 2008).

Da mesma maneira, o uso de diferentes marcas de *kit* de ELISA é outro fator que impossibilita a comparação dos resultados, porque os resultados gerados podem variar de acordo ao fabricante (SZÉKÁCS et al., 2010b). Por isso, alguns estudos levantam a questão de estandardizar os métodos de quantificação da proteína Cry1Ab em milho MON810 para poder obter resultados comparáveis (SZÉKÁCS et al., 2010b; SZÉKÁCS et al., 2012; THEN & LORCH, 2008).

Nas plantas avaliadas foi observada variação do conteúdo da proteína Cry1Ab mesmo que estas foram cultivadas em iguais condições e sendo do mesmo estágio de desenvolvimento (V2). Os níveis desuniformes da expressão do transgene já foram reportados anteriormente em outros estudos (NGUYEN & JEHLE, 2007; SZÉKÁCS et al., 2010a; THEN & LORCH, 2008) e a variação pode chegar a ser de até 20 vezes (ABEL & ADAMCZYK, 2004), assim como também pode ser que a planta não expresse a proteína Cry1Ab (THEN & LORCH, 2008). Para Nguyen & Jehle (2007) uma possível explicação para esta variação é que o número de plantas amostradas foi muito grande (1085), aspecto este que não ocorreu no presente estudo,

já que a amostragem foi de 8 plantas. É mais relevante hipotetizar que essa variação poderia ser causada por fatores ambientais ou fatores epigenéticos ou porque a modificação genética em si não seja estável (THEN & LORCH, 2008). A baixa expressão da proteína Cry1Ab na bainha e variação da expressão tanto no limbo como na bainha são importantes também do ponto de vista entomológico, porque a baixa produção da Cry1Ab poderia contribuir para desenvolver resistência de insetos alvos à proteína Cry1Ab (THEN & LORCH, 2008), o que já sendo comprovado em várias partes do mundo (TABASHNIK et al., 2013).

6.2 Comparação de protocolos de extração de Cry1Ab

Na literatura encontram-se descritos poucos protocolos para extrair a proteína Cry1Ab em milho MON810. Autores como Paul et al. (2010), Gruber et al. (2011), Pobozy et al. (2013) e Mekawi (2007) usaram diferentes protocolos de extração que consistem basicamente em uma lise celular seguida de um passo de centrifugação. Muitos desses protocolos foram usados para realizar Western Blot, ELISA ou purificação da proteína Cry1Ab. Para experimentos de purificação ou imunoprecipitação de proteínas Bt de plantas transgênicas, um fator importante é a quantidade de proteína extraída já que se precisa de grandes quantidades e a concentração da proteína Bt nas plantas transgênicas é muito baixa (WU et al., 2001).

Desta maneira, a existência de protocolos de extração com alto rendimento de extração da proteína Cry1Ab é essencial para futuras pesquisas. Os protocolos que mostraram maior rendimento de extração da proteína Cry1Ab em milho MON810 foram o de Mekawi (2009) e o Gruber et al. (2011), diferentemente do protocolo de Rocca pH 7,4, no qual se obteve o menor rendimento.

Esse último protocolo era similar ao protocolo de Rocca pH 10,6, pois só o pH é distinto, mas com este último obteve-se maior rendimento na extração de Cry1Ab. Então pode se atribuir

o rendimento do protocolo ao pH alcalino. Palm et al. (1994) mostraram que a extração da proteína Cry1Ab em tampão alcalino resulta em altos níveis de extração. Provavelmente, isto se deva ao fato da proteína ativa Cry1Ab ser solúvel a pH alcalino maior que 9,5 (BIETLOT et al., 1989). Isto explicaria o alto rendimento do protocolo de Mekawi (2009) que também usa um tampão de extração pH 10,8 mas não explicaria porque o protocolo de Rocca pH 10,6 que teve menor rendimento do que aquele.

Ambos os tampões de extração, de Mekawi (2009) e Rocca pH 10,6, tem pH alcalino, contem EDTA e NaCl. Embora, no protocolo de Rocca pH 10,6 foi usado o detergente Triton X-100, o rendimento não foi maior do que Mekawi (2009). Uma das diferenças entre ambos é que o protocolo de Mekawi (2009) usa DTT como agente redutor para previr indiretamente a oxidação de polifenóis, reduzindo-os na forma de tioéteres (LOOMI & BATAILE, 1966). Outra diferença é o tipo de tampão usado, no caso de protocolo de Mekawi (2009) usa CAPS e o outro usa Tris. A escolha do tampão é um fator importante porque esse deve ser selecionado de acordo com o pH que vai ser usado. No caso do uso de pH alcalino, ora 10,6 ora 10,8, a melhor opção é CAPS porque seu intervalo efetivo de pH é de 9,7 a 11,1, no entanto o intervalo do Tris é de 7 a 9,1 (HAYNES, 2014) o que não garante que o pH 10,6 tenha sido mantido. O tampão CAPS tem sido muito utilizado na ressuspensão e solubilização de Cry1Ab bacteriana (BONDZIO et al., 2013; HOSS et al., 2008; MASSON et al., 1998) devido ao seu intervalo efetivo de pH 9,7 a 11,1 (HAYNES, 2014).

A diferença no rendimento dos protocolos de Pobozy et al. (2013) e Rocca pH 7,4 poderia ser pelo detergente usado já que Pobozy et al. (2013) usa CHAPS ao invés de Triton X-100. Foi observado que CHAPS é mais eficiente em quebrar interações de proteína- proteína (LABETA et al., 1988) e solubilizar proteínas de membranas do que Triton X-100. (DI CIERO et al., 2004)

O protocolo de Gruber et al. (2011), que foi um dos que produziram maior rendimento, usa o tampão fosfato salino suplementado com o detergente Tween-20 (PBS-T). Foi demonstrado que esse último favorece a extração de Cry1Ab em solos (PALM et al., 1994). O PBS-T tem sido frequentemente utilizado como tampão de extração de Cry1Ab em plantas e solos para análises de ELISA (BADEA et al., 2010; GRUBER et al., 2011; PAUL et al., 2010; MUETING et al., 2014). Seu uso extensivo deve-se à alta eficiência de extração de Cry1Ab de até 91% (GRUBER et al., 2011; MUETING et al., 2014). Por isso que o PBS-T tem sido proposto como tampão de extração no método validado para extrair Cry1Ab em solos para ELISA (MUETING et al., 2014). Uma possível explicação para o alto rendimento do protocolo do Gruber et al. (2011) é que o tampão fosfato oferece sete vezes mais íons ao meio do que um tampão tricine no mesmo pH (GOOD & IZAWA 1972). Foi observado que existe uma correlação entre a quantidade de sais usada e a solubilização da proteína Cry1Ab, por isso que em tampões carbonato ou HEPES devem ser usados sais para ajudar na solubilização de Cry1Ab, contrariamente ao tampão CAPS que não precisa de sais (MANSON et al., 2002).

O tipo de protocolo de extração a usar dependerá do tipo de análises seguinte a extração. Se for o caso de realizar a extração para quantificar por ELISA se recomendaria usar o protocolo de Gruber et al. (2011) ao invés do protocolo de Mekawi porque o pH alcalino poderia interferir na sensibilidade do método (MUETING et al., 2014).

6.3 Caracterização da proteína Cry1Ab por Western Blot

O *dossie* da Monsanto, enviado as agências regulatórias, descreve que o evento MON810 deveria expressar uma proteína Cry1Ab truncada de 91 kDa porque tem no inserto o promotor 35S, o íntron hsp70, a versão truncada do gene Cry1Ab e ausência do terminador NOS3' (HERNANDEZ et al., 2003; ROSATI et al., 2008). Mas esta proteína de 91kDa não foi

encontrada nos estudos de Western Blot da proteína Cry1Ab no milho MON810 (BATISTA et al., 2005, GRUBER et al., 2011; MEKAWI, 2009; PAUL et al., 2010), mas sim e somente no estudo realizado pela Monsanto (CERA, 2014).

Os estudos da proteína Cry1Ab de milho MON810 relatam a presença de uma banda de 60 a 70 kDa correspondente ao núcleo ativo da proteína Cry1Ab (DE LUIS et al., 2010; GRUBER et al., 2011; MEKAWI, 2009; PAUL et al., 2010). Mas no presente estudo foram encontradas duas bandas imunoreativas, uma de 70 kDa e a outra 65 kDa no milho MON810; além de duas outras bandas de menor massa molecular (39 kDa e 34 kDa).

A presença de destas duas bandas de aproximadamente 60-70 kDa já foi anteriormente verificada em outro estudo, mas os autores não deram ênfase a esses resultados (BATISTA et al., 2005). Contudo, no estudo de Mekawi (2007), foi observou uma única banda imunoreativa de 69 kDa. As bandas de menor tamanho ao núcleo ativo da proteína Cry1Ab, já foram descritos em outros estudos (BATISTA et al., 2005; DE LUIS et al., 2010; GRUBER et al., 2011; PAUL et al., 2010). Gruber et al. (2011) e Paul et al (2010) reportaram a presença de bandas de 42 kDa, 34 kDa e 17 kDa em milho MON810, além da banda de 65 kDa. Porém, a banda de 17 kDa não foi encontrada em plantas de milho de cinco folhas mas sim nos estádios de floração e de amadurecimento (GRUBER et al., 2011). A banda mencionada também não foi encontrada nos nossos extratos protéicos de milho MON810 no estágio V2 (com três folhas).

No estudo de Luis et al. (2010) também foram detectadas bandas correspondentes a Cry1Ab que variaram de 17 kDa a 70 kDa na análise de Western Blot e confirmaram a identidade das bandas do SDS-PAGE por meio de Espectrometria de massa, indicando que as proteínas na banda correspondiam a Cry1Ab de *B. thuringiensis*.

142 Discussão

Diferentes tamanhos da proteína Cry1Ab não foram observados somente no evento MON810, também foram observados no evento Bt176 que expressa uma versão truncada da proteína Cry1Ab. Na análise de Western Blot do evento Bt176 também foram detectadas bandas imunorreativas de aproximadamente 60 kDa, 40 kDa e 36 kDa (CERA, 2014).

Os diferentes tamanhos da proteína Cry1Ab em milho MON810 poderiam ser justificados pelo fato da proteína estar sendo constantemente sintetizada e degradada na planta (GRUBER et al, 2011), sendo atribuídos à degradação pela ação das proteases endógenas da planta (DE LUIS et al, 2010; GRUBER et al., 2011; MEKAWI, 2009). Esse processo de degradação estaria ocorrendo em qualquer estágio de desenvolvimento do milho (GRUBER et al.,2011).

De Luis et al. (2010) discutiram que a degradação poderia estar ocorrendo durante o processo de extração, considerando que nesse estudo não foi usado nenhum tipo de inibidor de proteases. No presente estudo não houve este problema de degradação já que foram tomados os cuidados necessários, como macerar com nitrogênio líquida, não deixar esquentar as amostras trabalhando em gelo ou a 4°C e usar inibidor de proteases, portanto, não seria essa a justificativa para os diferentes tamanhos da proteína encontrados no presente estudo. Os mesmos cuidados foram tomados nos estudos de Gruber et al. (2011) e Paul et al. (2010). Além disso, foi usado PMSF, inibidor de serina proteases e em alguns dos tampões de extração foi usado EDTA que é inibidor de metaloproteases (CARPENTIER et al., 2005). Ambos os tipos de proteases são responsáveis pela proteólise de proteínas Bt em insetos (KIROUAC et al, 2006; PADMAJA et al., 2008; RAUSELL et al., 2007).

As duas bandas de 70 kDa e 65 kDa que foram detectadas nesse estudo poderiam corresponder ao núcleo ativo da proteína Cry1Ab, que é de aproximadamente 65 kDa

(GUIMARÃES et al., 2010). Mas a presença de duas bandas poderia ser produto da digestão da proteína Cry1Ab pelas proteases do milho MON810. No ensaio de digestão da protoxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* com suco do intestino médio de *Manduca sexta* foram observadas duas bandas entre 58-62 kDa e uma banda de ~30 kDa (LILLEY et al, 1980; MIRANDA et al., 2001). A banda de maior massa molecular foi produto de uma clivagem (hélice $\alpha 1$) e a segunda banda foi produto de duas clivagens na região N-terminal (hélice $\alpha 1$ e $\alpha 2$) (MIRANDA et al., 2001). A clivagem da hélice $\alpha 1$ é necessária para promover a oligomerização, ou seja a formação do pré-poro antes da sua inserção na membrana (ARENAS et al, 2010; GÓMEZ et al, 2002; PACHECO et al., 2009). O número de clivagens na proteína Cry vai depender do tipo de inseto (LIGHTWOOD et al., 2000; OGIWARA et al., 1992) e da protease usada, porque a clivagem com tripsina produz uma proteína clivada de diferente tamanho do que usando suco gástrico do inseto (MIRANDA et al., 2001). Os autores consideram que o fragmento de 30 kDa poderia ser resultado do processo de inativação da proteína Cry1Ab catalisado pelas proteases do intestino do inseto como um mecanismo de resistência (MIRANDA et al., 2001; SHAO et al., 1998). O processamento proteolítico das protoxinas é crucial não só pelo fato de ativar a protoxina também porque está envolvido com a especificidade da toxina no inseto (HAIDER et al., 1989) e a resistência de insetos (SHAO et al., 1998).

Nos extratos protéicos obtidos com o protocolo de Rocca pH 7,4 foram encontradas bandas imunorreativas de maior tamanho, aproximadamente de 120 kDa a 180 kDa. Mesmo presentes nos três extratos, estas não foram consideradas por motivo do tamanho variável da banda imunorreativa, mas esta variação do tamanho poderia ser justificada pelo fato de que as bandas não foram suficientemente separadas no gel já que o propósito do gel SDS-PAGE era separar proteínas entre 70 kDa a 30 kDa, e porque não era esperada a presença de proteínas maiores do que 91 kDa. No entanto, as bandas de 70 kDa e 65

kDa não foram detectadas nos extratos e sim as de 39 kDa e 34 kDa.

A presença da proteína Cry1Ab de maior tamanho poderia ocorrer porque o gene *cry1Ab* estaria sendo transcrito junto com a sequência adjacente na parte 3', devido a falta do terminador NOS 3', que não foi inserido durante o processo de transformação (HERNANDEZ et al., 2003; ROSATI et al., 2008). Por outro lado, as variações do tamanho da Cry (>70 kDa) poderiam ocorrer pela presença de uma série de deleções nos transcritos (ROSATI et al., 2008).

Outra possível explicação poderia ser que as proteínas Cry1Ab estariam formando oligômeros por provável clivagem da hélice $\alpha 1$ (ARENAS et al., 2010; GÓMEZ et al., 2002; PACHECO et al., 2009). A oligomerização da toxina Cry em soluções já foi encontrada anteriormente (AI et al., 2013; GUERECA & BRAVO et al., 1999; GUO et al., 2011) sendo que o pH 7,4 e a baixa concentração de sais na solução são propícios para formação de oligômeros (HELASSA et al., 2011; MASSON et al., 2002).

O processo de oligomerização é irreversível (MASSON et al., 2002) e por isso nem o DTT e nem a alta temperatura usados na desnaturação os desagrega (GUERECA & BRAVO, 1999; RAUSELL et al., 2004b). Foi reportado também na literatura que a interação entre monômeros Cry1Ab é um passo prévio para a formação do poro na membrana do intestino do inseto (SOBERON et al., 2000). Os oligômeros podem se ligar a receptor aminopeptidase (APN) da membrana de intestino médio do inseto (MUÑOZ-GARAY et al., 2009), o qual induz à inserção de este na membrana, levando à formação do poro e, finalmente, à lise celular (ARENAS et al., 2010; PARDO-LÓPEZ et al., 2006). Também foi reportado que os oligômeros se inserem de forma mais eficiente em vesículas de membrana, em comparação ao monomérico Cry1Ab (GOMEZ et al., 2002).

O fato da proteína Cry1ab estar na forma ativa na planta pode ser uma estratégia arriscada, porque alguns insetos podem sobreviver com dieta com proteína Bt já que não tem as proteases para ativar a protoxina (OPPERT et al., 1997). Além disso, os insetos ao consumir milho MON810 estão expostos a quatro tamanhos diferentes da proteína Cry1Ab e, portanto, seria importante saber qual é a atividade inseticida de cada um deles. As proteínas de 60-70 kDa poderiam ter igual ou diferente capacidade inseticida já que poderiam ser produto de diferentes números de clivagens. Por outro lado, as proteínas de 39 kDa e 34 kDa poderiam ser versões inativas da proteína (MIRANDA et al. 2001). Se for esse o caso, no momento da quantificação da proteína Cry1Ab mediante ELISA estaria-se superestimando o valor da concentração da proteína Cry1Ab com real poder inseticida, porque o ELISA não quantifica exclusivamente a proteína Cry1Ab de 60-70 kDa, mas também fragmentos menores de até 17 kDa (EMMERLING et al., 2011; WIEDEMANN et al., 2006), cuja atividade ainda não foi pesquisada.

6.4 Ponto Isoelétrico da proteína Cry1Ab

Neste estudo, a proteína Cry1Ab foi detectada na faixa de pI 4,9 a 5,3 em três diferentes massas moleculares (70 kDa, 39 kDa e 34 kDa) e na região de 70k Da de PI 4 a 4,2. No entanto, os *spots* da proteína Cry1Ab eram pouco definidos e foi observada a presença de linhas horizontais (*streaks*), o que sugere a incompleta focalização das proteínas na primeira dimensão (RABILLOUD, 2000). A aparição de “linhas horizontais” no gel poderia dever-se à presença de componentes interferentes nas amostras, como lipídeos, fenóis e polissacarídeos (SARAVANAN & ROSE, 2004), que não foram retirados na extração. Provavelmente, as amostras analisadas continham interferentes porque a extração foi realizada em tampão PBS com Tween-20 sem adicionar algum agente redutor, como DTT, e sem um passo adicional de extração com fenol. Um indício da presença de polifenóis nas amostras foram os pellets de coloração

marrom (WU et al., 2014) e o aumento do tempo da focalização isoeétrica (CARPENTIER et al., 2005).

Outra possível causa seria a presença de sais nas amostras (BIO-RAD, 2014) porque tanto o Western Blot 2D da proteína purificada Cry1Ab ativa quanto das amostras protéicas de milho MON810 evidenciaram a presença de “linhas horizontais”. Além disso, a proteína purificada não podia conter polifenóis, carboidratos, entre outros, mas esta foi ressuspendida em PBS (sais) e colocada diretamente na solução de reidratação para a focalização.

Por outro lado, a análise por Western Blot 2D das amostras protéicas de milho MON810 extraídas segundo o protocolo descrito por Carpentier et al. (2005), o qual inclui um passo de extração fenólica, não mostrou nenhum sinal de reconhecimento da proteína Cry1Ab. Provavelmente a proteína foi perdida durante o processo de extração, considerando que a concentração da proteína Bt na planta é baixa (WU et al., 2001). No entanto, o fenol tem sido usado para separar proteínas Cry de complexos de DNA-Cry (BIETLOT et al., 1993; CLAIRMONT et al., 1998; XIA et al., 2005).

Metodologias mais sofisticadas como purificação por HPLC foram usadas para obter Cry1Ab de milho, como foi realizado no trabalho de Mekawi (2009) que separou a proteína Cry1Ab do milho MON810 por HPLC e a caracterizou por Espectrometria de massa. De fato, este é o único trabalho de caracterização de Cry1Ab proveniente de milho transgênico. O estudo revelou que o PI da Cry1b de 69 kDa era 6,5.

Os valores do PI da proteína Cry1Ab reportados aqui foram menores do que os encontrados na literatura talvez pela focalização incompleta das proteínas na primeira dimensão. Mesmo assim, o PI da proteína Cry1Ab de bactéria reportado na literatura varia a cada estudo. No estudo de Bietlot et al. (1989)

mostrou que o PI da toxina Cry1Ab (66 kDa) era 5,5 quando a focalização isoeétrica era realizada em géis nativos e 6 quando era realizada em géis de uréia. No entanto, outro estudo indica que o PI da toxina Cry1Ab era 10,7 (YAMAMOTO & MC LAUGHLIN, 1981). Também foi usado a ferramenta *Theoretical pI/Mw, ExPASy* para calcular o PI da toxina Cry1Ab e seus domínios I, II e III, resultando 6,4, 4,7, 9,4 e 9,6, respectivamente (SANDER et al., 2010). Igualmente, Huang et al. (2004) usaram a mesma ferramenta para calcular o PI da protoxina, resultando o valor de 5,04, e para os três domínios I, II e III foi 4,76, 7,21 e 10,83, respectivamente.

No presente estudo foi detectada a proteína em três massas moleculares diferentes (70 kDa, 39 kDa e 34 kDa) de igual maneira que no Western Blot 1D de extratos protéicos de milho MON810. No trabalho de Mekawi (2009) só foi encontrada a proteína Cry1Ab de 69 kDa e não as proteínas Cry1Ab de menores tamanhos (65 kDa, 39 kDa e 34 kDa) reportados aqui e em outros estudos (GRUBER et al., 2011; PAUL et al., 2010). O fato de encontrar a proteína Cry1Ab de dois tamanhos diferentes e de menores tamanhos dá indícios de que estão ocorrendo processos de pós-transcrição ou pós-tradução na planta (ANDOW & HILBECK, 2004).

6.5 Detecção de possíveis proteínas que interagem com a proteína Cry1Ab

As modificações realizadas no protocolo de Mekawi (2009) para realizar a extração de proteínas de milho parecem não mudar o rendimento de extração da proteína Cry1Ab, já que a função do EDTA e do DTT no tampão é de inibir as metaloproteases e de prevenir indiretamente a oxidação de polifenóis, respectivamente (LOOMI & BATAILE, 1966). Porém, a concentração da proteína Cry1Ab nos extratos protéicos foi menor do que os valores reportados anteriormente no teste de comparação de protocolos de extração (seção 5.3). Isto pode ter ocorrido devido a possibilidade que as amostras tiveram de ser

degradadas durante o envio ao laboratório onde foram analisadas na Noruega, já que permaneceram descongeladas por vários dias. Por outro lado, a quantificação para este ensaio foi realizada por ELISA, enquanto no teste de comparação foi usado o método de Western Blot. Este último método tem um passo de desnaturação das proteínas antes da corrida, já na técnica de ELISA as amostras são colocadas diretamente na placa. Além disso, foi reportado que a sensibilidade do ELISA pode ser afetada pelos reagentes usados na solução que está a proteína (MUETING et al., 2014). Contudo, a concentração de proteínas nos extratos está no rango de valores reportados na literatura (ABEL & ADAMCZYK, 2004; NGUYEN & JEHLE, 2007; SZÉKÁCS et al., 2010a; SZÉKÁCS et al., 2010b; SZÉKÁCS et al., 2012; THEN & LORCH, 2008).

Nos géis 2D das amostras imunoprecipitadas não foi detectada a proteína Cry1Ab mesmo que o experimento tenha iniciado usando 12 ml de extrato protéico por gel, o que seria ~4,8 µg Cry1Ab segundo a análise de ELISA, quantidade suficiente para ser detectada com a tecnologia DIGE se não ocorrer perda da proteína no processo. Mas, o gel 2D não apresentou *spots* de outras proteínas, além do anticorpo, e isto se deve provavelmente à perda de proteína nos passos do ensaio de imunoprecipitação e da eletroforese 2D.

No ensaio de imunoprecipitação, o uso de amostra controle, como uma proteína purificada Cry1Ab ativa de concentração conhecida, poderia ter ajudado na verificação da quantidade de proteína recuperada no passo de incubação, lavagem das *beads* e na eluição. Após a imunoprecipitação e precipitação das amostras, a quantificação com o 2-D Quant Kit mostrou que não havia proteínas presentes, mas o ensaio de Western Blot revelou a presença da proteína Cry1Ab, isto se deve ao fato de que no Western Blot se pode detectar proteínas de até 1 pg, diferente do 2-D Quant Kit que detecta proteína na faixa de 0,5-50 µg. Mesmo que nas amostras estava presente a Cry1Ab,

nos géis 2D somente foram detectados os *spots* do anticorpo policlonal usado na imunoprecipitação.

No processo do 2D, de fato ocorre a perda de proteínas nas diferentes fases do processo (ZHOU et al., 2005) e somente no carregamento da amostra pode perder-se até 55% de proteínas (DÉPAGNE & CHEVALIER, 2012; ZHOU et al., 2005). Em nosso estudo foi usado o método de reidratação em gel, porque previamente tinha-se testado o método “cup-loading” e não foi obtido nenhum spot no gel 2D (dado não mostrado). Mostafaie et al. (2011) obtiveram melhor resultado usando o método de reidratação em gel do que usando o método “cup-loading”. Igualmente, ocorre perda de proteínas durante a focalização (7 a 14%), o equilíbrio (17 a 24%) e a segunda dimensão (>10%) (ZHOU et al., 2005). Todos esses motivos poderiam ter sido os causais do resultado obtido nos géis 2D mesmo que tenha sido usada a tecnologia DIGE que tem alta sensibilidade de detecção (25 pg).

A análise por Espectrometria de massa das amostras imunoprecipitadas mostrou presença de proteínas “contaminantes” mesmo que as *beads* magnéticas tenham sido lavadas 5 vezes. O número de lavagens não foi aumentado no ensaio porque isto incrementa o risco de perda de interações fracas e aumenta a chance de desmontar complexos de proteínas (HAVE et al., 2011). Já o uso de outro tipo de detergente em maior concentração (0,5% Triton X-100) não favoreceu na diminuição das proteínas contaminantes. Porém, foi reportado que concentrações de detergente maiores do que 0,05% diminuem a quantidade de proteínas imunoprecipitadas, por isso é recomendado o uso de baixas concentrações de detergente (0,05%) nos experimentos de imunoprecipitação, especialmente para proteínas de baixa concentração (YANG et al., 2008). Para identificar as proteínas contaminantes nos ensaios de imunoprecipitação necessita-se de um controle (HAVE et al., 2011), que para nosso estudo foram as amostras de milho isogênico. As possíveis proteínas que poderiam estar interagindo

com a proteína Cry1Ab segundo o ensaio de imunoprecipitação foram 45 proteínas, mas não todas as proteínas identificadas poderiam estar se ligando a proteína Cry1Ab, muitas destas talvez se ligaram inespecificamente as *beads* magnéticas ou ao anticorpo (TRINKLE-MULCAHY et al., 2008).

Por outro lado, a análise de Ligand blot de proteínas de milho indica que possivelmente a proteína Cry1Ab esta se ligando a uma proteína de milho de 18 kDa. A proteína de 18 kDa estaria presente no extrato protéico de milho MON810 e de milho isogênico extraídos de acordo com o protocolo de Mekawi (2009). Através da análise de Espectrometria de massa foram identificadas nove proteínas em comum nas bandas de 18 kDa dos extratos protéicos de milho transgênico e isogênico. Entre as nove proteínas identificadas provavelmente uma delas seja a proteína que se ligou a Cry1Ab.

O ensaio de Western Blot da amostra de milho isogênico extraída com o protocolo de Rocca evidenciou uma banda imunorreativa de 18 kDa, que poderia dever-se a reação cruzada do anticorpo e não por causa da presença de Cry1Ab como ocorreu com a banda de 18 kDa da amostra de milho MON810 extraído com o mesmo protocolo, já que antes de iniciar o ensaio foi verificada a ausência de Cry1Ab por tiras de fluxo lateral e depois, por Espectrometria de massa.

A análise de Western Blot revelou uma banda imunoreativa da proteína Cry1Ab de 36 kDa nos dois extratos protéicos de milho MON810 obtidos com diferentes protocolos de extração. Porém, não foi identificada a proteína Cry1Ab por Espectrometria de massa, talvez isto tenha ocorrido porque ao cortar a banda do gel esta não foi cortada na posição exata onde foi a detectada a banda imunorreativa, já que para localizar a banda foi sobreposta a imagem do Ligand Blot no gel corado.

Outra possível explicação, menos provável, é que o anticorpo reconheceu alguma proteína que estava presente nos

extratos protéicos de milho MON810 e a única proteína compartilhada em ambos os extratos protéicos foi uma proteína que apresentava homologia com uma proteína de milho desconhecida (Nº de acesso 194701900). Mas, conforme os resultados dos experimentos de Western Blot 1D e 2D e Espectrometria de massa realizados neste estudo nas secções anteriores e ao estudo de Luis et al (2010), se consideraria que a primeira explicação seria a mais consistente. No estudo de Luis et al.(2010) foi encontrada a proteína Cry1Ab de milho MON810 de diferentes tamanhos moleculares, variando de 17 kDa a 70 kDa, segundo a análise de Western Blot e Espectrometria de massa.

Portanto, como se pode observar em ambos os ensaios, de imunoprecitação e Ligand Blot, a proteína Cry1Ab poderia estar se ligando a alguma proteína endógena do milho. Dentre as proteínas identificadas no ensaio de imunoprecipitacao foram encontradas duas proteínas identificadas no ensaio de Ligand Blot de proteínas de milho com Cry1Ab (Tabela 7). As duas proteínas apresentavam homologia com proteínas de milho: a proteína não caracterizada LOC1001944054 e a proteína nucleosídeo difosfato quinase I.

A alta quantidade de proteínas identificadas poderia ser atribuída ao fato de que a proteína Cry tem habilidade de ligar-se a outras proteínas que não sejam receptores de membrana do BBMV (*Brush border membrane vesicles*) de insetos (KITAMI et al., 2011). O estudo de Kitami et al (2011) revelou que a Cry pode se ligar à alfa glucosidase de *Sacharomyces cerevisiae*, B-glucosidase de amêndoa, urease de feijão, gliceraldeído 3-fosfato deidrogenase (GAPDH) de galinha, hexoquinase de levedura, ovoalbumina de galinha, ribonuclease pancreática bovina e bovino soro albumina (BSA). Outro estudo demonstrou que a Cry se liga a proteínas biotiniladas (DU & NICHERRSON et al., 1996). Incluso a Cry pode ligar-se a B-galactosidase, a qual é usada como marcador molecular de proteína no SDS-PAGE (SANCHIS & ELLAR, 1993). Muitas dessas proteínas se ligam ao domínio III da Cry (KITAMI et al., 2011). Esta habilidade de ligação a

vários tipos de proteínas de diferentes organismos se deve ao dobramento do domínio III similar ao dobramento da *galactose-binding domain-like* que tem uma cavidade de ligação a multiplas proteínas (KITAMI et al., 2011). Em outros organismos foi observado que a *galactose-binding domain-like* funciona como sitio de ligação de fosfolipídios (MACEDO-RIBEIRO et al., 1999), carboidratos (BORASTON et al., 2002; GASKELL et al., 1995) e DNA (MARINTCHEV et al., 1999).

Além disso, foi observado que a estrutura tridimensional do domínio II da proteína Cry é semelhante à estrutura de três lectinas de planta: jacalina de *Moraceae*, aglutinina de *Maclura pomifera*, lectina de *Helianthus tuberosus* (BOONSERM et al., 2006; BOURNE et al., 1999; PIGOTT et al., 2007; SARASWATHY & KUMAR et al., 2004). Outro estudo mostrou que o domínio II de Cry5B se assemelha à lectina de banana (HUI et al., 2012). Sendo que o domínio II está envolvido na ligação do receptor e na determinação da especificidade (DE MAAGD et al., 1996).

Adicionalmente à habilidade de Cry de poder se ligar a proteínas, foi reportado que Cry também se liga ao DNA (AI et al., 2013; BIETLOT et al., 1993; CLAIRMONT et al., 1998; GUO et al., 2011; XIA et al., 2005). Na bactéria *B. thuringiensis* foi observado que o DNA é um componente do cristal protéico que interage especificamente com a protoxina (BIETLOT et al., 1993; CLAIRMONT et al., 1998). A Cry forma complexos com o DNA tanto na forma de toxina quanto na forma de protoxina, ambas se associam a DNA de 20kpb (CLAIRMONT et al., 1998; AI et al., 2013). No processo de ativação da protoxina, a toxina continua interagindo com um DNA de menor tamanho (100pb) e que finalmente, resulta em uma toxina Cry1Ab livre de DNA por ação de DNases (BIETLOT et al., 1993; CLAIRMONT et al., 1998).

A possibilidade de Cry1Ab do milho MON810 estar ligada ao DNA não foi testada em nosso estudo, porque

precisaríamos de um método de purificação da proteína muito eficiente devido as baixas concentrações de Cry1Ab e ter realizado testes de DNA, de digestão enzimática, proteolítica, entre outros. Mas os resultados obtidos nos experimentos realizados neste estudo sugerem que a toxina Cry1Ab presente no milho MON810 provavelmente não esteja ligada a DNA.

Primeiro, porque o processo de associação de DNA e a protoxina começa na formação do cristal dentro da *B. thuringiensis* (BIETLOT et al, 1993). Mas isso não impede que a proteína possa se ligar ao DNA, porque a região da Cry que interage com DNA é a região N-terminal, a qual está presente na Cry1Ab do milho MON810, e são apenas três os nucleotídeos de DNA que interagem com a toxina (CLAIRMONT et al.,1998). Porém, a tentativa de reconstituir o complexo usando toxina livre e 20 kpb DNA isolado, não teve êxito (CLAIRMONT et al., 1998). Os autores consideraram que o fracasso poderia ser devido a uma falha nas condições de reconstituição e as diferentes conformações da protoxina e toxina livre de DNA. Se for o caso da proteína Cry1Ab estar ligada a DNA, a associação não poderia ter sido quebrada pelo pH do tampão de extração porque o complexo DNA-toxina se mantém estável independente do pH (GUO et al., 2011).

Ai et al. (2013) evidenciaram que a toxina livre de DNA era mais susceptível a digestão por proteases que o complexo toxina-DNA. Nossos resultados de ensaio de Western Blot revelaram a presença de proteínas Cry1Ab menores a 91 kDa, uma possível explicação já mencionada foi que esses tamanhos sejam produto da ação de proteases do milho (DE LUIS et al., 2010; GRUBER et al., 2011; MEKAWI, 2007).

Por outro lado, a associação toxina-DNA protege a toxina de formar oligômeros (AI et al., 2013). A possível formação de oligômeros nos extratos protéicos de milho MON810 foi sugerida na secção 6.2 com base na detecção de

bandas imunorreativas maiores de 120 kDa no ensaio de Western Blot.

A possível presença de uma toxina livre de DNA no milho MON810 indicaria que a toxina teria uma estrutura relaxada pronta para ser reconhecida pelo receptor do inseto, já que a eliminação do DNA da toxina é requerida para atividade inseticida da toxina (AI et al., 2013) e a proteína livre poderia formar oligômeros, os quais se inserem mais eficientemente na membrana do que os monômeros Cry1Ab (GOMEZ et al., 2002). Por este motivo, a proteína Cry1Ab poderia ter efeito inseticida não só em espécies alvo, mas também em insetos não alvo.

De acordo com nossos resultados e com os estudos citados, sugere-se que a proteína Cry1Ab de milho poder ligar-se a uma proteína do milho por possuir o domínio III com uma cavidade de ligação de múltiplas proteínas, por ter o domínio II similar a algumas proteínas de plantas e pela presença da proteína Cry1Ab de tamanhos menores do que 91 kDa.

7 CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados obtidos no ensaio de DAS-ELISA, o conteúdo da proteína Cry1Ab é diferente em diferentes partes da folha, sendo maior no limbo do que na bainha. Apesar da pequena amostragem utilizada neste estudo (n= 8 plantas) pôde se observar variação da proteína Cry1Ab entre indivíduos, mesmo que as plantas tenham crescido nas mesmas condições.
- Os rendimentos de extração da proteína Cry1Ab de folhas de milho MON810 podem variar em função do protocolo de extração utilizado. Dentro dos cinco protocolos testados, os maiores rendimentos de extração da proteína Cry1Ab foram obtidos usando os protocolos de Gruber et al. (2011) e de Mekawi (2009).
- A proteína Cry1Ab expressa na folha de milho MON810 tem quatro diferentes tamanhos moleculares (70 kDa, 65 kDa, 39 kDa e 34 kDa). As proteínas de massa molecular 70 kDa e 65 kDa poderiam ser produto de clivagens e especula-se que poderia estar ocorrendo a clivagem da hélice $\alpha 1$, já que foi observada a presença de oligômeros nos extratos protéicos de milho MON810 extraídos segundo o protocolo de Rocca pH 7,4.
- De acordo com os resultados obtidos no ensaio de imunoprecipitação e Ligand Blot, a proteína Cry1Ab poderia estar se ligando a proteínas endógenas do milho. E o ensaio de Ligand Blot sugere que a proteína Cry1Ab poderia estar se ligando com uma proteína de 18 kDa de milho. Esses resultados abrem a possibilidade de continuar com essa linha de estudo para poder determinar exatamente quais proteínas estão interagindo com a proteína Cry1Ab. Além disso, outros métodos podem ser usados, dentro deles a bioinformática. Assim, seria possível ampliar a possibilidade de detecção da interação da proteína

156 Conclusões

Cry1Ab com outras moléculas presentes na planta hospedeira, além de outras moléculas como DNA, carboidratos, entre outros.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS E SUGERENCIAS FINAIS.

Para a realização dos trabalhos de pesquisa com proteínas, especialmente com milho transgênico, é importante ter disponível metodologias estabelecidas e estandarizadas para poder ter resultados inequívocos e reproduzíveis em um curto tempo. Várias das metodologias utilizadas nos estudos com plantas transgênicas não estão estabelecidas devido a escassez de trabalhos na área, pois o interesse pela análise de riscos dos OGM recém vem aumentando nos últimos anos. Essa lacuna dificulta a pesquisa. Desta forma, é recomendável primeiro propor o desenvolvimento de metodologias e estandariza-las para que os resultados possam ser reproduzíveis.

Por outro lado, em futuros estudos há que se considerar que a proteína Cry1Ab é uma proteína de baixa concentração na planta e por isso, o uso de protocolos com um menor número de passos podem garantir a presença da proteína Cry1Ab nas amostras e evitar a perda desta. No caso de experimentos para determinar o ponto isoeletrico da proteína Cry1Ab seria recomendável usar algum tipo de dispositivo para purificar a amostra e concentrá-la, de tal forma que não se perca a baixa quantidade de proteína expressa na planta transgênica durante o processo.

Os resultados obtidos no presente trabalho servirão como base para a realização de futuros estudos com a proteína Cry do milho MON810, já que varias dos protocolos testados e as metodologias usadas poderiam ser utilizados nas futuras pesquisas. Além disso, várias das questões levantadas aqui poderiam ser assunto de futuras pesquisas e ser elucidadas, logrando assim aprofundar o conhecimento sobre o que está ocorrendo dentro do milho MON810.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, C. & ADAMCZYK, J. Relative Concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorl leaf profiles. **Journal of Economic Entomology**, v.97, n.5, p.1737-1744, 2004.
- AGAPITO-TENFEN S.Z., GUERRA M.P., WIKMARK O.G., & NODARI R.O. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different agroecosystems conditions in Brazil. **Proteome Science**, v.11, p.1-15, 2013.
- AGBIOS. Safety assessment of YieldGard insect-protected event MON810. 2002.
- AI, B.; LI, J.; FENG, D.; LI, F.; GUO, S. The Elimination of DNA from the Cry Toxin-DNA Complex Is a Necessary Step in the Mode of Action of the Cry8 Toxin. **Plos One**, v.8, n. e81335, p.1-9, 2013.
- ANDOW, D. & HILBECK A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **Bioscience**, v.54, p.637-649, 2004.
- ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.17, p.12497-12503, 2010.
- ATSUMI, S.; INOUE, Y.; ISHIZAKA, T.; MIZUNO, E.; YOSHIZAWA, Y.; KITAMI, M.; SATO, R. Location of the *Bombyx mori* 175kDa cadherin-like protein-binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **FEBS Journal**, n.275, p.4913-4926, 2008.
- BADEA, E.; CHELU, F.; LACATUȘU, A. Results regarding the levels of Cry1Ab protein in transgenic corn tissue (MON810) and

160 Referências bibliográficas

the fate of Bt protein in three soil types. **Romanian Biotechnological Letters**, v.15, n.1, p.55-62, 2010.

- BAKER, J.; HAWKINS, N.; WARD, J.; LOVEGROVE, A.; NAPIER, J.; SHEWRY P.; BEALE, M. A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. **Plant Biotechnology Journal**, v.4, n.4, p.381-392, 2006.
- BALSAMO, G.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.; BERTOLDO, J.; TERENCE, H.; ARISI, A. Proteomic analysis of four brazilian MON810 maize varieties and their four non-genetically-modified isogenic varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.21, p.11553-11559, 2011.
- BARROS, E.; LEZAR, S.; ANTONEN, M.; VAN DIJK J.; RÖHLIG R.; KOK, E.; ENGEL, K. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotechnology Journal**, v.8, n.4, p.436-451, 2010.
- BATISTA, R.; NUNES, B.; CARMO, M.; CARDOSO, C.; JOSÉ, H.; DE ALMEIDA, A.; MANIQUE, A.; BENTO, L.; RICARDO, C.; OLIVEIRA, M. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.116, p.403–410, 2005.
- BAYYAREDDY K, ANDACHT TM, ABDULLAH MA & ADANG MJ. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.39, p.279–286, 2009.
- BERGGÅRD, T.; LINSE, S.; JAMES, P. Methods for the detection and analysis of protein–protein interactions. **Proteomics**, v.7, n.16, p.2833-2842, 2007.
- BIETLOT, H.; CAREY, P.; CHOMA, C.; KAPLAN, H.; LESSARD, T.; POZSGAY, M. Facile preparation and

161 Referências bibliográficas

- characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. **Biochemical Journal**, v.260, p.87-91, 1989.
- BIETLOT, H.; SCHERNTHANER, J.; MILNE, R.; CLAIRMONT, F.; BHELLA, R.; KAPLAN, H. Evidence That the CryIA crystal protein from *Bacillus thuringiensis* is associated with DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.11, p.8240-8245, 1993.
 - BIO-RAD. Preventing Horizontal Streaks on 2-D Gels. Tips and techniques. Disponível em: <http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/PreventingHorStreaks.pdf>. Acesso em: 10/10/2014.
 - BLACKMER, T. & SCHEPERS, J. Use of a chlorophyll meter to monitor nitrogen status and schedule fertigation for corn. **Journal of Production Agriculture**, v.8, n.1, p.56-60, 1995.
 - BØHN, T.; PRIMICERIO, R.; HESSEN, D.; TRAAVIK, T. Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-transgenic maize variety. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 584–592, 2008.
 - BØHN, T.; TRAAVIK, T.; PRIMICERIO, R. Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic Bt-maize. **Ecotoxicology**, v.19, n.2, p.419-430, 2010.
 - BONDZIO, A.; LODEMANN, U.; WEISE, C.; EINSPANIER, R. Cry1Ab treatment has no effects on viability of cultured porcine intestinal cells, but triggers hsp70 expression. **Plos One**, v.8, n.e67079, p. 1-9, 2013.
 - 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. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.9, p.3391-3401, 2006.

162 Referências bibliográficas

- BORASTON, A.; NURIZZO, D.; NOTENBOOM, V.; DUCROS, V.; ROSE, D.; KILBURN D.; DAVIES, G. Differential oligosaccharide recognition by evolutionarily-related beta-1,4 and beta-1,3 glucan-binding modules. **Journal of Molecular Biology**, v.319, n.5, p.1143-1156, 2002.
- BOURNE, Y.; ZAMBONI, V.; BARRE, A.; PEUMANS, W.; VAN DAMME, E.; ROUGÉ, P. *Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. **Structure**, v.7, p.1473-1482, 1999.
- BRASIL, 2007a. Resolução Nº 3, 5 de março. Parecer Técnico da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, favorável à liberação comercial de milho geneticamente modificado, evento MON810. Disponível em <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11445.html>. Acesso em 18/08/2014.
- BRASIL, 2007b. Resolução Nº4, 16 de agosto. Dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado, visando à coexistência entre os sistemas de produção. Disponível em <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/4687.html>. Acesso em 18/08/2014.
- BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1667, n.1, p.38-46, 2004.
- BRAVO, A.; GILL, S. ; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon Journal**, v.49, n.4, p.423-435, 2007.
- BRUNS, H. & ABEL, C. Nitrogen fertility effects on Bt deltaendotoxin and nitrogen concentrations of maize during early growth. **Agronomy Journal**, v.95, p.207-211, 2003.

163 Referências bibliográficas

- CACCIA, S.; MOAR, W.; CHANDRASHEKHAR, J.; OPPERT, C.; ANILKUMAR, K.; JURAT-FUENTES, J.; FERRÉ, J. Association of Cry1Ac toxin resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie) with increased alkaline phosphatase levels in the midgut lumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.16, p.5690–5698, 2012.
- CARPENTIER, S.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v.5, p.2497–2507, 2005.
- CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H.; ENGEL, K.; GATEHOUSE, A.; KÄRENLAMPI, S.; KOK, E.; LEGUAY, J.; LEHESRANTA, S.; NOTEBORN, H.; PEDERSEN, J.; SMITH, M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, n.7, p.1089-1125, 2004.
- CERA. GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C. 2014.
- CLAIRMONT, F.; MILNE, R.; PHAM, V.; CARRIÈRE, M.; KAPLAN, H. Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.15, p.9292-9296, 1998.
- COHEN, S.; CHANG, A.; BOYER, H.; HELLING, R. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.70, n.11, p.3240-3244, 1973.
- COLL, A.; NADAL, A.; PALAUDELMÀS, M.; MESSEGUER, J.; MELÉ, E.; PUIGDOMÈNECH, P.; PLA, M. Lack of repeatable differential expression patterns between MON810 and comparable commercial varieties of maize. **Plant Molecular Biology**, v.68, n.1, p.105-117, 2008.

164 Referências bibliográficas

- COLL, A.; NADAL, A.; COLLADO, R.; CAPELLADES, G.; MESSEGUER, J.; MELÉ, E.; PALAUDELMÀS, M.; PLA, M. Gene expression profiles of MON810 and comparable non-GM maize varieties cultured in the field are more similar than are those of conventional lines. **Transgenic Research**, v.18, n.5, p.801-808, 2009.
- COLL, A.; NADAL, A.; ROSSIGNOL, M.; PUIGDOMÈNECH, P.; PLA, M. Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. **Transgenic Research**, v.20, n.4, p.939-949, 2011.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira, graos. V.2-Safra 2014/15. N.2-Segundo levantamento-intencao de plantio novembro/2014. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_11_13_09_19_35_boletim_graos_novembro_2014.pdf. Acesso em 10/11/2014.
- CORPILLO, D.; GARDINI, G.; VAIRA, A.; BASSO, M.; AIME, S.; ACCOTTO, G.; FASANO, M. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: The case of a virus-resistant tomato. **Proteomics**, v.4, n.1, p.193-200, 2004.
- COVIELLA, C; MORGAN, D.; TRUMBLE, J. Interactions of elevated CO₂ and nitrogen fertilization: effects on production of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic plants. **Environment Entomology**, v.29, n.4, p.781-787, 2000.
- CTNBio. 2014. Pareceres técnicos sobre aprovação de eventos geneticamente modificados. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>. Acesso em 10/11/2014.
- DE LUIS, R.; LAVILLA, M.; SÁNCHEZ, L.; CALVO, M.; PÉREZ, M. Pepsin Degradation of Cry1A(b) Protein Purified from

- Genetically Modified Maize (*Zea mays*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.2548–2553, 2010.
- DE MAAGD, R.; KWA, M.; VAN DER KLEI, H.; YAMAMOTO, T.; SCHIPPER, B.; VLAK, J.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p. 1537–1543, 1996.
 - DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v.17, n.4, p.193-199, 2001.
 - DÉPAGNE, J. & CHEVALIER, F. Technical updates to basic proteins focalization using IPG strips. **Proteome Science**, v.10, n.54, p.1-9, 2012.
 - DI CIERO, L.; BELLATO, C.; MEINHARDT, L.; FERRARI, F.; CASTELLARI, R; MARANGONI, S; NOVELLO, J. Assessment of four different detergents used to extract membrane proteins from *Xylella fastidiosa* by two-dimensional electrophoresis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.3, p.269-274, 2004.
 - DOYLE, J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
 - DU, C. & NICKERSON, K. The *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin binds biotin-containing proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.8, p.2932-2939, 1996.
 - DUFRESNE-MARTIN, G.; LEMA, J.; LAVIGNE, P.; KLARSKOV, K. Peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of proteins detected by immunostaining on nitrocellulose. **Proteomics**, v.5, p.55–66, 2005.
 - DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*.

166 Referências bibliográficas

Entomologia Experimentalis et Applicata, v.114, p. 161–169, 2005.

- EMBRAPA, 2011. Embrapa Milho e Sorgo: Sistema de produção do milho, 7ª edição. Disponível em http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_7ed/economia.htm. Acesso em 17/08/2014.
- EMMERLING, C.; STRUNK, H.; SCHÖBINGER, U.; SCHRADER, S. Fragmentation of Cry1Ab protein from Bt-maize (MON810) through the gut of the earthworm species *Lumbricus terrestris* L. **European Journal of Soil Biology**, v.47, n.2, p.160-164, 2011.
- FAO. 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. FAO. 2001. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s08.htm#P0_0. Acesso em 20/05/2014.
- FAO. 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Frequently Asked Questions about FAO and Agricultural Biotechnology. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/biotech/docs/faqs.pdf. Acesso em 20/08/2014.
- FAO. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em 05/11/2014.
- FINAMORE, A.; ROSELLI, M.; BRITTI, S.; MONASTRA, G.; AMBRA, R.; TURRINI, A.; MENGHERI, E. Intestinal and Peripheral Immune Response to MON810 Maize Ingestion in Weaning and Old Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.11533-11539, 2008.

- FLORES-ESCOBAR, B.; RODRÍGUEZ-MAGADAN, H.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Differential Role of *Manduca sexta* Aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.15, p.4543–4550, 2013.
- FORSBACH, A.; SCHUBERT, D.; LECHTENBERG, B.; GILS, M.; SCHMIDT, R. A comprehensive characterisation of single-copy T-DNA insertions into the *Arabidopsis thaliana* genome. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.161–176, 2003.
- FREE, R. B.; HAZELWOOD, L. A.; SIBLEY, D. R. Identifying Novel Protein-Protein Interactions Using Co-Immunoprecipitation and Mass Spectroscopy. In: GERFEN, C.; HOLMES, A.; SIBLEY, D.; SKOLNICK, P.; WRAY, S. (Ed.). **Current Protocols in Neuroscience**. ed: John Wiley & Sons, Inc, 2009. p.5.28.1-5.28.14.
- GAHAN, L.; GOULD, F.; HECKEL, D. Identification of a Gene Associated with Bt Resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, v.293, n.5531, p.857-860, 2001.
- GALEANO, P.; DEBAT, C. M.; RUIBAL, F.; FRAGUAS, L. F.; GALVÁN, G. A. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. **Environmental Biosafety Research**, v.9, n.03, p.147-154, 2010.
- GARCÍA-CAÑAS, V.; SIMÓ, C.; LEÓN, C.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. MS-based analytical methodologies to characterize genetically modified crops. **Mass Spectrometry Reviews**, v.30, n.3, p.396-416, 2011.
- GASKELL, A.; CRENNELL, S.; TAYLOR, G. The three domains of a bacterial sialidase: a β -propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. **Structure**, v. 3, n.11, p.1197–1205, 1995.

168 Referências bibliográficas

- GOLDBERG, R.; KISHORE, N.; LENNER, R. Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers in water. In: HAYNE, W. (Ed.). **Handbook of chemistry and physics**. ed: CRC, 2014. p. 7-29.
- GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SÁNCHEZ, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix a-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters**, v.513, p.242–246, 2002.
- GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.45, p.34032-9, 2006.
- GOOD, N. & IZAWA, S. Hydrogen ion buffers, In: SAN PIETRO, A. (Ed). **Methods in Enzymology**, ed: Academic Press, 1972. v.24, p.53-68.
- GORDON, J.; SCANGOS, G.; PLOTKIN, D.; BARBOSA, J.; RUDDLE, F. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 77, n.12, p.7380-4, 1980.
- GRIFFITS, J.; HASLAM, S.; YANG, T.; GARCZYNSKI, S.; MULLOY, B.; MORRIS, H.; CREMER, P.; DELL, A.; ADANG, M.; AROIAN, R. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science**, v. 307, p. 922–925, 2005.
- GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, v.254, p.447–464, 1995.

- GRUBER, H.; PAUL, V.; GUERTLER, P.; SPIEKERS, H.; TICHOPAD, A.; MEYER, H. H.; MUELLER, M. Fate of Cry1Ab Protein in Agricultural Systems under Slurry Management of Cows Fed Genetically Modified Maize (*Zea mays* L.) MON810: A Quantitative Assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.13, p.7135-7144, 2011.
- GÜERECA, L.; BRAVO, A. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1429, n.2, p.342-50, 1999.
- GUIMARAES, V.; DRUMARE, M.; LERECLUS, D.; GOHAR, M.; LAMOURETTE, P.; NEVERS, M.; VAISANEN-TUNKELROTT, M.; BERNARD, H.; GUILLON, B.; CRÉMINON, C.; WAL, J.; ADEL-PATIENT, K. In vitro digestion of Crylab proteins and analysis of the impact on their immunoreactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.5, p.3222-31, 2010.
- GUO, S.; LI, J.; LIU, Y.; SONG, F.; ZHANG, J. The role of DNA binding with the Cry8Ea1 toxin of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 317, p. 203–210, 2011.
- HAIDER, M.Z.; SMITH, G.P.; ELLAR, D.J.; 1989. Delineation of the toxin coding fragments and an insect-specificity region of a dual toxicity *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **FEMS Microbiology Letters**, v.49, p.157–163, 1989.
- HELASSA, N.; REVAULT, M.; QUIQUAMPOIX, H.; DÉJARDIN, P.; STAUNTON, S.; NOINVILLE, S. Adsorption on montmorillonite prevents oligomerization of Bt Cry1Aa toxin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.356, p. 718–725, 2011.
- HERNÁNDEZ, M.; PLA, M.; ESTEVE, T.; PRAT, S.; PUIGDOMÈNECH, P.; FERRANDO, A. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard® based on the 3-transgene integration sequence. **Transgenic Research**, v.12, p.179–189, 2003.

170 Referências bibliográficas

- HILBECK, A.; MOAR, W.; PUSZTAI-CAREY, M.; FILIPINI, A.; BIGLER, F. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environment Entomology**, v.27, n.5, p.1255–1263, 1998.
- HOLCK, A.; VAĪTILINGOM M.; DIDIERJEAN, L.; RUDI, K. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. **European Food Research and Technology**, v.214, p.449-454, 2002.
- HÖSSA, S.; ARNDTB, M.; BAUMGARTEC, S.; TEBBEC, C.C.; NGUYEND, H.T.; JEHLLED, J.A. Effects of transgenic corn and Cry1Ab protein on the nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.70, p.334–340, 2008.
- HUANG, Z.; GUAN, C.; GUAN, X. Cloning, characterization and expression of a new cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* WB9. **Biotechnology Letters**, v.26, p.1557–1561, 2004.
- HUI, F.; SCHEIB, U.; HU, Y.; SOMMER, R.; AROIAN, R.; GHOSH, P. The structure and glycolipid-binding properties of the nematocidal protein Cry5B. **Biochemistry**, v.51, n.49, p.9911-9921, 2012.
- JAMES, C. 2013. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA Briefs No. 46. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA): Ithaca, NY, US, 2013.
- JIMÉNEZ-JUÁREZ, N.; MUÑOZ-GARAY, C.; GÓMEZ, I.; GILL, S.; SOBERÓN, A.; BRAVO, A. The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. **Peptides**, v.29, n.2, p.318–323, 2008.
- JIN, T.; CHANG, X.; GATEHOUSE, A.; WANG, Z.; EDWARDS, M.; HE, K. Downregulation and mutation of a Cadherin gene associated with Cry1Ac resistance in the Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). **Toxins**, v.6, n.9, p.2676-93, 2014.

171 Referências bibliográficas

- KIROUAC, M.; VACHON, V.; QUIEVY, D.; SCHWARTZ, J.; LAPRADE, R. Protease inhibitors fail to prevent pore formation by the activated *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in insect brush border membrane vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.1, p.506–515, 2006.
- KITAMI, M.; KADOTANI, T.; NAKANISHI, K.; ATSUMI, S.; HIGURASHI, S.; ISHIZAKA, T.; WATANABLE, A. SATO, R. *Bacillus thuringiensis* Cry toxins bound specifically to various proteins via domain III, which had a galactose-binding domain-like fold. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.75, n.2, p.305-12, 2011.
- KRISHNAMOORTHY, M.; JURAT-FUENTES, J.; MCNALL, R.; ANDACHT, T.; ADANG, M. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p.189–201, 2007.
- LABETA, M.; FERNANDEZ, N.; FESTENSTEIN, H. Solubilisation effect of Nonidet P-40, Triton X-100 and CHAPS in the detection of MHC-like glycoproteins. **Journal of Immunological Methods**, v.112, p.133-138, 1988.
- LI, D.; FAN, K.; WU, J.; YING, Y. Magnetic Beads Transfer Based Assay for Cry1 Ab Protein. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v.39, n.9, p.1318-1322, 2011.
- LIGHTWOOD, D.; ELLAR, D.; JARRETT, P. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.5174–5181, 2000.
- LILLEY, M.; RUFFELL, R.; SOMERVILLE, H. Purification of the Insecticidal Toxin in Crystals of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of General Microbiology**, v.118, p.1, 1980.
- LOOMIS, W. & BATTAILE, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. **Phytochemistry**, v.5, p.423-438, 1966.

172 Referências bibliográficas

- LU, Y.; WU, K.; JIANG, Y.; XIA, B.; LI, P.; FENG, H.; WYCKHUYS, K.; GUO, Y. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of bt cotton in china. **Science**, v.328, n.5982, p.1151-1154, 2010.
- MAATY, W. Identification and purification of a novel high-affinity receptor BTR250 from Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) for *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. **Arab Journal of Biotechnology**, v.7, n.2, p.197-208, 2004.
- MACEDO-RIBEIRO, S.; BODE, W.; HUBER, R.; QUINN-ALLEN, M.; KIM, S.; ORTEL, T.; BOURENKOV, G.; BARTUNIK, H.; STUBBS, M.; KANE, W.; FUENTES-PRIOR, P. Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. **Nature**, v.402, p.434-439, 1999.
- MARINTCHEV, A.; MULLEN, M.; MACIEJEWSKI, M.; PAN, B.; GRYK, M.; MULLEN, G. Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. **Nature Structural and Molecular Biology**, v.6, n.9, p.884-93, 1999.
- MARVIER, M.; MCCREEDY, C.; REGETZ, J.; KAREIVA, P. A Meta-Analysis of Effects of Bt Cotton and Maize on Nontarget Invertebrates. **Science**, v.316, n.5830, p.1475-1477, 2007.
- MASSON, L.; ERLANDSON, M.; PUZSTAI-CAREY, M.; BROUSSEAU, R.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; FRUTOS, R. A Holistic Approach for Determining the Entomopathogenic Potential of *Bacillus thuringiensis* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.12, p.4782-4788, 1998.
- MASSON, L.; MAZZA A.; SANGADALA, S.; ADANG, M.; BROUSSEAU, R. Polydispersity of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins in solution and its effect on receptor binding kinetics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1594, n.2, p.266-275, 2002.
- MCNALL, R. & ADANG, M. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut

- through proteomic analysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.33, p.999–1010, 2003.
- MEKAWI, E. **Biochemical investigations on genetically modified crops**. 2009. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Faculdade de Ciências Naturais, Universidade de Hohenheim, Hohenheim, 2009.
 - MILLSTONE, E.; BRUNNER, E.; MAYER, S. Beyond ‘Substantial equivalence’. **Nature**, v.401, p.525-526, 1999.
 - MIRANDA, R.; ZAMUDIO, F.Z.; BRAVO, A. Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.1155–1163, 2001.
 - MOSTAFAIE, A.; YARI, K.; KANI, S. A comparative evaluation of rehydration and cuploading sample application for modified twodimensional gel electrophoresis of human serum proteins using immobilized pH gradient. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.55, p.11711-11715, 2011.
 - MUETING, S.; STRAIN, K.; LYDY, M. Validation of an extraction method for Cry1Ab protein from soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n.1, p.18–25, 2014.
 - MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; DARSZON, A.; DE MAAGD, R.A.; BAKKER, P.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different cry toxins. **Journal of Membrane Biology**, v. 212, p. 61–68, 2006.
 - MUÑOZ-GARAY, C.; PORTUGAL, L.; PARDO-LÓPEZ, L.; JIMÉNEZ-JUÁREZ, N.; ARENAS, I.; GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, R.; ARROYO, R.; HOLZENBURG, A.; SAVVA, C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active

174 Referências bibliográficas

against Cry1Ab-resistant insects. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1788, p. 2229–2237, 2009.

- NGUYES, H. & JEHLE, J. Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize Mon810. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.114, n.2, p. 82-87, 2007.
- NODARI, R. & GUERRA, M. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar (Biossegurança de plantas transgênicas). **Revista de Nutrição**, v.16, n.1, p.105-116, 2003.
- OGIWARA, K.; INDRASITH, L.; ASANO, S.; HORI, H. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.121–126, 1992.
- OPPERT, B.; KRAMER, K.; BEEMAN, R.; JOHSON, D.; MCGAUGHEY, W. Proteínase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.23473–23476, 1997.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants. Paris: OECD, 1993a.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concepts and Principles. Paris: OECD. 1993b.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidance for the designation of a unique identifier for transgenic plants. Paris: OECD. 2004.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). An introduction to the food/feed safety consensus documents of the task force. Paris: OECD. 2006.

175 Referências bibliográficas

- PADMAJA, T.; SUNEETHA, N.; SASHIDHAR, R.; SHARMA, H.; DESHPANDE, V.; VENKATESWERLU, G. Degradation of the insecticidal toxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* by extracellular proteases produced by *Chrysosporium* sp. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1171–1181, 2008.
- PALM, C.; DONEGAN, K.; HARRIS, D.; SEIDLER, R. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. **Molecular Ecology**, v.3, p.145-151, 1994.
- PARDO-LÓPEZ, L.; GÓMEZ, I.; RAUSELL, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. **Biochemistry**, v.45, p.10329–10336, 2006.
- PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Letters**, v.37, p.3–22, 2013.
- PAUL, V.; GUERTLER, P.; WIEDEMANN, S.; MEYER, H. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize (MON810) in relation to total dietary feed proteins in dairy cow digestion. **Transgenic research**, v.19, n.4, p.683-689, 2010.
- PHIZICKY, E. & FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiological Reviews**, v.59, n.1, p.94-123, 1995.
- PIGOTT, C. & ELLAR, D. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, n.2, p.255-81, 2007.
- POBOZY, E.; FILABER, M.; KOC, A.; GARVIA-REYES, J. Application of Capillary Electrophoretic Chips in Protein Profiling of Plant Extracts for Identification of Genetic Modifications of Maize. **Electrophoresis**, v.34, n.18, p.2740–2753, 2013.

176 Referências bibliográficas

- QUIST, D & CHAPELA, I. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. **Nature**, v.414, p.541-543, 2001.
- RABILLOUD, T & CHEVALLET, M. Solubilization of Proteins in Two-Dimensional Electrophoresis. In: RABILLOUD, T (Ed) **Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods**. ed: Springer, 2000. p.9-29.
- RAMIREZ-ROMERO, R; DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; CHAFFIOL, A.; PHAM-DELÈGUE, M. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotoxicology Environmental Safety Journal**, v.70, n.2, p.327-333, 2008.
- RAUSELL, C.; MUÑOZ-GARAY, C.; MIRANDA-CASSOLUENGO, R.; GÓMEZ, I.; RUDIÑO-PIÑERA, E.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. **Biochemistry**, v. 43, n.1, p.166-74, 2004a.
- RAUSELL, C.; PARDO-LÓPEZ, L.; SÁNCHEZ, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; MORERA, C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Unfolding Events in the Water-soluble Monomeric Cry1Ab Toxin during Transition to Oligomeric Pre-pore and Membrane-inserted Pore Channel. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.53, p.55168–55175, 2004b.
- RAUSELL, C.; OCHOA-CAMPUZANO, C.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.; BRAVO, A.; REAL, M. A membrane associated metalloprotease cleaves Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin reducing pore formation in Colorado potato beetle brush border membrane vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1768, p.2293–2299, 2007.
- RITCHIE, S.; HANWAY, J.; BENSON, G. How a Corn Plant Develops (Special Report 48), Ames, Iowa: Iowa State University of Science and Technology/Cooperative Extension Service. 1992.

- RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; ZAVALA, L. E.; MUÑOZ-GARAY, C.; JIMÉNEZ-JUÁREZ, N.; PACHECO, S.; MASSON, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Dominant Negative Mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Function as Anti-Toxins: Demonstration of the Role of Oligomerization in Toxicity. **PLoS One**, v.4, n.5, p.e5545, 2009.
- ROSATI, A.; BOGANI, P.; SANTARLASCIO, A.; BUIATTI, M. Characterisation of 3' transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 YieldGard maize. **Plant Molecular Biology**, v.67, n.3, p.271-281, 2008.
- SAMOLSKI, I. **Evaluación de la resistencia al complejo viral del camote inducida por silenciamiento post-transcripcional de genes en plantas transgénicas de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) transformadas vía *Agrobacterium tumefaciens***. 2004.157 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Biologia) – Universidad Nacional Agraria La Molina, 2004.
- SANCHIS, V. & ELLAR, D. Identification and partial purification *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. **FEBS Letters**, v.316, p.264-268, 1993.
- SANDER, M.; MADLIGER, M.; SCHWARZENBACH, R. P. Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to SiO₂. 1. Forces driving adsorption. **Environmental Science & Technology**, v.44, n.23, p.8870-8876, 2010.
- SANDERS, P.; ELSWICK, E.; GROTH, M.; LEDESMA, B. Evaluation of insect protected maize lines in 1994 U.S. field test locations. Study No. 94-01-39-01, MSL-14179, unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID No. 43665502. 1995
- SANVIDO, O.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Ecological Impacts of Genetically Modified Crops: Ten Years of Field Research and Commercial Cultivation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.107, p.235-278. 2007.

178 Referências bibliográficas

- SARAVANAN, R. & ROSE, J. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v.4, n.9, p.2522–2532, 2004.
- SARASWATHY, N. & KUMAR, P.A. Protein engineering of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.7, n.2, p.180-190, 2004.
- SCHWARTZ, J.; JUTEAU, M.; GROCHULSKI, P.; CYGLER, M.; PRÉFONTAINE, G.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. **FEBS Letters**, v.410, p.397–402, 1997.
- SÉRALINI G.; CELLIER, D.; DE VENDOMOIS, J. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v.52, p.596-602, 2007.
- SÉRALINI, G.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D., DE VENDÔMOIS, J. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.11, p.4221-4231, 2012.
- SHAO, Z.; CUI, Y.; LIU, X.; YI, H.; JI, J.; YU, Z., 1998. Processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and thetots. **Journal Invertebrate Pathology**, v.72, p.73–81, 1998.
- SHARMA H. C.; SHARMA K.; SEETHARAMA N.; ORTIZ R. Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvements. **Electronic Journal of Biotechnology**,. v.3, p.1-20, 2000.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p.850–858, 1996.

179 Referências bibliográficas

- SHIMADA, N.; MIYAMOTO, K.; KANDA, K.; MURATA, H. Binding of Cry1Ab toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin to proteins of the bovine intestinal epithelial cell: An in vitro study. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v.42, n.1-2, p.45–49, 2006.
- SOBERÓN, M.; PÉREZ, R.; NUÑEZ-VALDÉZ, M.; LORENCE, A.; GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A. Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEMS Microbiology Letters**, v.191, p.221-225, 2000.
- SOBERÓN, M.; GILL, S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p.1337–1349, 2009.
- SZABADOS, L.; KOVÁCS, I.; OBERSCHALL, A.; ABRAHÁM, E.; KEREKES, I.; ZSIGMOND, L; NAGY, R.; ALVARADO, M.; KRASOVSKAJA, I.; GÁL, M.; BERENTE, A.; RÉDEL, G.; HAIM, A.; KONCZ, C. Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the Arabidopsis genome. **Plant Journal**, v.32, p.233–242, 2002.
- SZÉKÁCS, A.; LAUBER, E.; TAKÁCS, E.; DARVAS, B. Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of MON 810 transgenic maize. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, n.6, p.2203-2211, 2010a.
- SZÉKÁCS, A.; LAUBER, E.; JURACSEK, J.; DARVAS, B. Cry1Ab toxin production of MON810 transgenic maize. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.29, n. 1, p.182–190, 2010b.
- SZÉKÁCS, A. & DARVAS, B. Comparative aspects of Cry toxin usage in insect control. pp 195-230. In: ISHAAYA, I., PALLI, S. R. & HOROWITZ, A. R. (Eds) **Advanced Technologies for Managing Insect Pests**. ed: Springer, 2012. p.159.

180 Referências bibliográficas

- TABASHNIK, B.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 510–521, 2013.
- TEN HAVE, S.; BOULON, S.; AHMAD, Y.; LAMOND, A. I. Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics - The user's guide. **Proteomics**, v.11, n.6, p.1153-1159, 2011.
- THEN, C. & LORCH, A. A simple question in a complex environment: how much Bt toxin do genetically engineered MON810 maize plants actually produce?. In: BRECKLING, B; REUTER, H; VERHOEVEN, R. (Eds) **Implications of GM-crop cultivation at large spatial scales. Theorie in der Ökologie 14**. ed: Peter Lang, 2008. p.17-21.
- THEN, C. Risk assessment of toxins derived from *Bacillus thuringiensis* – synergism, efficacy, and selectivity. **Environmental Science Pollution Research**, v.17, p.791–797, 2010.
- TRINKLE-MULCAHY, L.; BOULON, S.; LAM, Y.; URCIA, R.; BOISVERT, F.; VANDERMOERE, F.; MORRICE, N.; SWIFT, S.; ROTHBAUER, U.; LEONHARDT, H; LAMOND, A. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. **Journal of Cell Biology**, v.183, n.2, p.223–239, 2008.
- TZFIRA, T.; LI, J.; LACROIX, B.; CITOVSKEY, V. Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. **Trends in Genetics**, v. 20, n.8, p.375–383, 2004.
- WIEDEMANN, S.; LUTZ, B.; KURTZ, H.; SCHWARZ, F.; ALBRECHT, C. In situ studies on the time-dependent degradation of recombinant corn DNA and protein in the bovine rumen. **Journal of Animal Science**, v.84, p.135–144, 2006.
- WU, Z.; XU, B.; CHEN, Z. Separation and Purification of *Bacillus Thuringiensis* (Bt) Toxic Protein CryIAb from Transgenic Rice by

181 Referências bibliográficas

- Ion-Exchange Chromatography. **Chromatographia**, v.53, n.9/10, p.571-573, 2001.
- WU, X.; XIONG, E.; WANG, W.; SCALI, M.; CRESTI, M. Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. **Nature protocols**, v.9, n.2, 2014.
 - XIA, L.; SUN, Y.; DING, X.; FU, Z.; MO, X.; ZHANG, H.; YUAN, Z. Identification of cry-Type Genes on 20-kb DNA associated with Cry1 crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, v.51, p.53–58, 2005.
 - YAMAMOTO, T.; MCLAUGHLIN, R. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. kvrstaki toxic to the mosquito larva *Aedes taeniorhynchus*. **Biochemical and Biophysical Research**, v.103, n.2, p.414-421, 1981.
 - ZAVALA, L.; PARDO-LÓPEZ, L.; CANTÓN, P.; GÓMEZ, I.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin remain exposed to the solvent after insertion of part of domain I into the membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.19109–19117, 2011.
 - ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. ; TAUSSIG, R.; BULLA L. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.
 - ZHOU, S.; BAILEY, M.; DUNN, M.; PREEDY, V.; EMERY, P. A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. **Proteomics**, v.5, p.2739–2747, 2005.
 - ZOLLA, L.; RINALDUCCI, S.; ANTONIOLI, P.; RIGHETTI, P. Proteomics as a Complementary Tool for Identifying Unintended Side Effects Occurring in Transgenic Maize Seeds As a Result of

182 Referências bibliograficas

Genetic Modifications. **Journal of Proteome Research**, v.7, n.5, p.1850-1861, 2008.

10 APÊNDICE

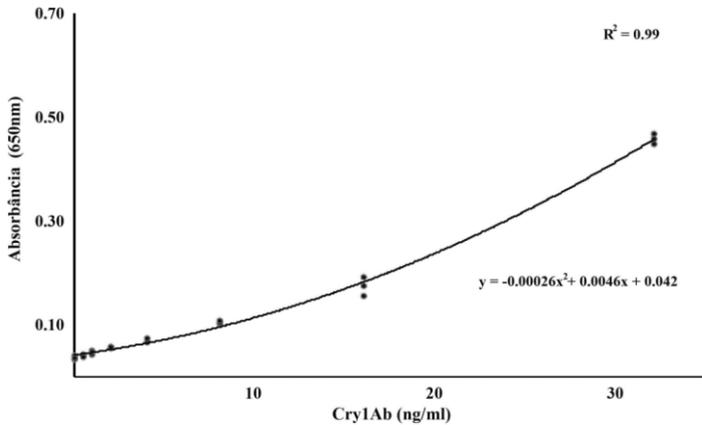


Figura 1. Curva padrão da absorvância de 650 nm em função da concentração da proteína purificada Cry1Ab ativa (ng/ml) usando regressão polinomial quadrática. Absorvância observada (pontos), regressão quadrática de curva padrão (linha sólida).

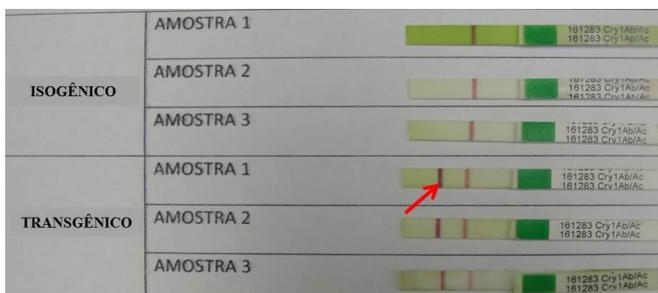


Figura 2. Tiras de fluxo lateral usadas para detectar a presença de proteína Cry1Ab em amostras de milho transgênico e isogênico. A seta vermelha indica a segunda linha (linha de teste) que confirma a presença de proteína Cry1Ab.

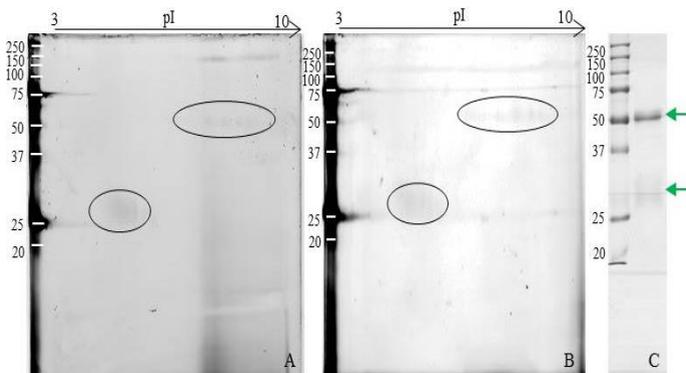


Figura 3. Gel 2D de proteínas imunoprecipitadas dos extratos de milho MON810 (A) e isogênico (B), precipitadas em metanol com acetato de amônio e solubilizadas em tampão uréia/tiouréia. M: marcador de massa molecular (kDa). SDS-PAGE de anticorpo imunoprecipitado das beads magnéticas (C). A seta verde e os óvalos indicam o anticorpo policlonal anti-Cry1Ab.

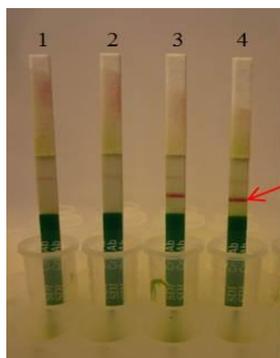


Figura 4. Extratos protéicos testados com tiras para a detecção da proteína Cry1Ab. Linha 1: amostra protéica de milho isogênico extraído com o protocolo de Mekawi (2009). Linha 2: amostra protéica de milho isogênico extraído com o protocolo de Rocca pH 10,6. Linha 3: amostra protéica de milho MON810 extraído com o protocolo de Mekawi (2009). Linha 4: amostra protéica de milho MON810 extraído com o protocolo de Rocca pH 10,6. Seta vermelha: segunda linha (linha de teste) indica a presença da proteína Cry1Ab.